

**EFEK PREVENTIF KEFIR SARI KEDELAI PADA  
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR  
BORAKS MELALUI PAKAN BERDASARKAN  
AKTIVITAS PROTEASE DAN GAMBARAN  
HISTOPATOLOGI JEJUNUM**

**SKRIPSI**

**Oleh :  
BUYUNG YAHYA  
NIM. 115130100111013**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

# LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

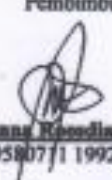
Efek Preventif Kefir Sari Kedelai Pada Tikus Putih  
(*Rattus norvegicus*) yang Dpapar Boraks Melalui Pakan  
Berdasarkan Aktivitas Protease dan Gambaran  
Histopatologi Jejenum

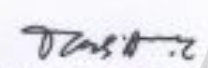
Oleh :  
BUYUNG YAHYA  
NIM. 115130100111013

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 8 Agustus 2018  
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

  
Dra. Anna Rhoediana M. Ap., Sc.  
NIP. 19580711 199203 2 002

  
drh. Drsh Ayu Oktavianis AP., M. Biotech  
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

  
Prof. Dr. Asnan'um, drh., DES  
NIP. 19500911 198302 2 001

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : BUYUNG YAHYA

NIM : 115130100111013

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Efek Preventif Kefir Sari Kedelai Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)  
yang Dipapar Boraks Melalui Pakan Berdasarkan Aktivitas Protease dan  
Gambaran Histopatologi Jejunum

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 8 Agustus 2018  
Yang menyatakan

( **BUYUNG YAHYA** )  
NIM. 1151301000111013

## Efek Preventif Kefir Sari Kedelai Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Boraks Melalui Pakan Berdasarkan Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Jejunum

### ABSTRAK

Boraks merupakan bahan kimia yang dilarang digunakan sebagai bahan pengawet makanan. Boraks dapat mendorong timbulnya ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang menghasilkan senyawa radikal bebas dalam jumlah besar dan bersifat toksik. Proses fermentasi pada kefir sari kedelai dapat meningkatkan daya antioksidan dalam sari kedelai. Tujuan penelitian ini mengetahui potensi dalam kefir sari kedelai sebagai terapi preventif untuk mencegah peningkatan aktivitas protease dan mencegah kerusakan histopatologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar pakan mengandung boraks. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap menggunakan 20 ekor tikus yang dibagi lima kelompok : kontrol negatif (A), kontrol positif yang dipapar pakan boraks 10.300 ppm (B) dan kelompok Preventif dengan dosis kefir sari kedelai: 0,5 ml/100gBB, 1 ml/100gBB, dan 1,5 ml/100gBB (yaitu kelompok C, D, dan E). Aktivitas protease diukur menggunakan spektrofotometer serta dihitung dengan uji ragam *One-way ANOVA* dan uji BNJ menggunakan *SPSS for windows 17.0*. Pembuatan preparat histopatologi organ jejunum menggunakan pewarnaan *Hematoksin-Eosin* (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Hasil penelitian menunjukkan pemberian kefir sari kedelai dapat menurunkan aktivitas protease secara signifikan ( $p < 0,05$ ) dan dapat mencegah kerusakan histopatologi jejunum berupa hemoragik, deskuamasi epitel dan infiltrasi sel radang. Kesimpulan dari penelitian ini pada pemberian kefir sari kedelai dosis terbaik 1,5 ml/100gBB dapat meningkatkan persentase penurunan aktivitas protease paling tinggi. Gambaran histopatologi jejunum terlihat adanya perbaikan mukosa jejunum dan berkurangnya infiltrasi sel radang.

**Kata Kunci :** Aktivitas protease, Boraks, Histopatologi jejunum, Kefir sari kedelai

## **The Effect Preventive of Soymilk Kefir on Rat's (*Rattus norvegicus*) Exposed to Borax Through Feed Based on The Activity of Protease and The Description of Jejunum Histopathology**

### **ABSTRACT**

Borax is prohibited chemical compound to be used as food preservatives. Borax is able to boost the emergence of ROS (*Reactive Oxygen Species*) that produces toxic free radical compounds in large quantity. Fermentation on soymilk kefir can improve the durability of soya extract. The experiment aimed to determine the potency of soymilk kefir to prevent the increase of protease activity and prevent the rat's (*Rattus Norvegicus*) jejunum damage that was exposed to the feed which contained borax. The experiment used 20 rats in randomized rat design that was classified into five groups : Negative control (A), positive control that was exposed to the feed containing borax 10.300 ppm (B), and preventive group with soya extract kefir, the dosage : 0.5 ml/100g BW, 1 ml/100g BW, 1.5 ml/100g BW and feed containing borax simultaneously (those were group C, D, and E). Protease activity was measured using spectofotometer and calculated using *One-Way ANOVA* test and *BNJ test SPSS for windows 17.0* as well. The jejunum organ histopathology preparat used *Hematoksilin-Eosin* (HE) colouring and it was observed that using optical microscope with 400x magnification. Experiment result showed soymilk kefir preventive could prevent the increase of protease activity to significantly ( $p < 0,05$ ). A high reduction percentage of protease activity showed the most appropriate dosage 1.5 ml/100g BW. The description of jejunum histopathology showed there was an improvement of jejunum mucosa and the decreasing of inflammatory cells.

**Key Words** : Borax , Jejunum histopathology, Protease activity, Soymilk kefir

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadapan Allah SWT yang melimpahkan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya. Shalawat dan salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Agung Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir skripsi ini yang berjudul “Efek Preventif Kefir Sari Kedelai pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Boraks Melalui Pakan berdasarkan Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Jejunum” ini dapat diselesaikan. Tugas akhir skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Penyusun menyampaikan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada seluruh pihak yang membantu membimbing, memotivasi dan memperlancar dalam menyelesaikan tugas akhir skripsi ini, secara khusus mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App.,Sc dan drh. Dyah Ayu Oktavianie AP., M.Biotech selaku dosen pembimbing atas bimbingan, waktu, kesabaran dan motivasi dalam penulisan tugas akhir skripsi ini.
2. drh. Aulia Firmawati, M.Vet. dan drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech Selaku dosen penguji atas tanggapan dan saran yang diberikan.



3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.
4. Keluarga penulis, Ayahanda, Ibunda, Adik tercinta yang senantiasa memberikan doa, dorongan, dan semangat yang tiada henti.
5. Seluruh staf dan asisten laboratorium Biokimia Fakultas MIPA dan Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri Malang atas bantuan yang telah diberikan selama penulis melakukan penelitian.
6. Sahabat dalam penelitian Rizka Putri Ika Erti, Dzunnuraini Syukri, Nur Lailatul Mufida, dan Dini Enggal Rizqi Lestari teman seperjuangan melaksanakan penelitian.
7. Keluarga besar kelas A 2011 khususnya dan semua kolega FKH UB yang telah menjadi keluarga baru selama proses pendidikan di Kedokteran Hewan dan menjadi dorongan untuk mencapai puncak kesuksesan.
8. Rekan seperjuangan dan kawan akrab KONTRAKAN 516 : Agung Widiantera, Akhtur Gumilang, Moh. Prayoga Utomo, dan M Iqbal Afif atas motivasi, semangat, bantuan, belajar bersama tentang kekeluargaan serta semangat berjuang di kota perantauan.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan tugas akhir skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

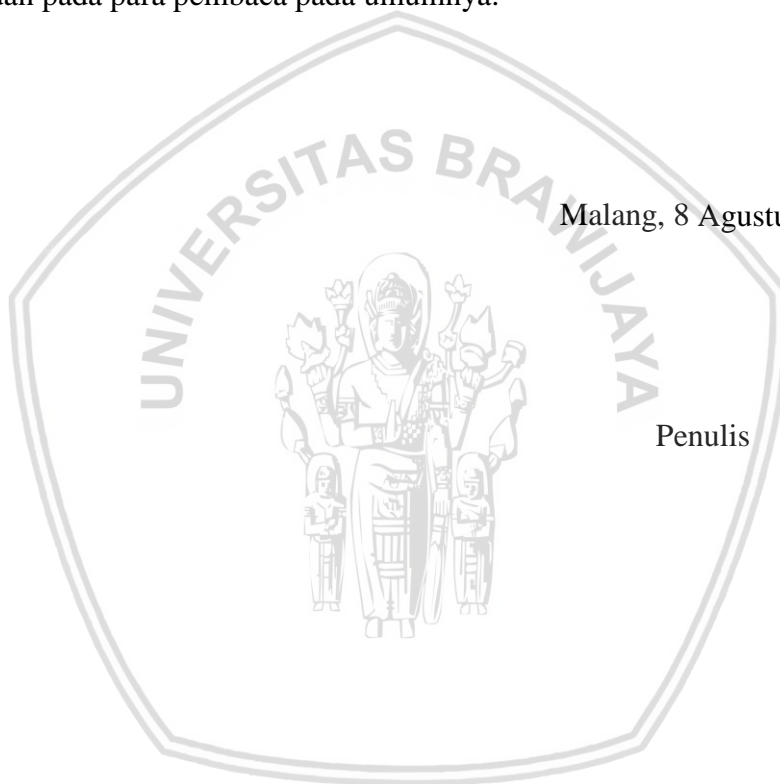
Penulis menyadari bahwa tugas akhir skripsi ini tentu jauh dari kesempurnaan mengingat keterbatasan pengetahuan dan referensi yang penulis miliki. Oleh karena itu, kritik dan saran yang sifatnya konstruktif sangat penulis

harapkan dari berbagai pihak. Sekali lagi penulis mengucapkan banyak terima kasih dan penulis mohon maaf apabila terdapat kekurangan dalam penulisan tugas akhir skripsi.

Akhirnya hanya kepada ALLAH SWT kita kembalikan semua urusan dan semoga tugas akhir skripsi ini bisa bermanfaat bagi semua pihak, khususnya pada penulis dan pada para pembaca pada umumnya.

Malang, 8 Agustus 2018

Penulis





## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG .....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Batasan Masalah .....	5
1.4 Tujuan Penelitian .....	6
1.5 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>8</b>
2.1 Boraks .....	8
2.1.1 Pengertian Boraks .....	8
2.1.2 Kegunaan Boraks .....	8
2.1.3 Efek Boraks pada Tubuh .....	9
2.1.4 Patomekanisme Boraks .....	9
2.2 Hewan Coba Tikus Putih( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	13
2.3 Hubungan Aktivitas Protease Terhadap Dampak Pemberian Boraks.....	15
2.4 Histopatologi usus (jejunum).....	16
2.5 Kefir Sari Kedelai .....	18
2.5.1 Definisi .....	18
2.5.2 Antioksidan dalam Kefir Sari Kedelai .....	19
2.6 Mekanisme Kerja Antioksidan .....	21
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....</b>	<b>23</b>
3.1 Kerangka Konseptual .....	23
3.2 Hipotesis Penelitian .....	25
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>26</b>
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	26
4.2 Sampel Penelitian.....	26
4.3 Rancangan Penelitian .....	27
4.4 Variabel Penelitian .....	28
4.5 Alat dan Bahan .....	28
4.5.1 Alat .....	28
4.5.2 Bahan .....	28
4.6 Tahapan Penelitian .....	29
4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan .....	29
4.6.2 Penentuan Dosis Boraks dan kefir .....	29

4.6.3 Pembuatan Sediaan Pakan Mengandung Boraks dan Cara Pemaparan Pada Hewan Coba .....	30
4.6.4 Pembuatan Kefir Sari Kedelai dan Cara pemberian .....	31
4.6.5 Uji Konfirmasi Kandungan Boraks Pakan .....	32
4.6.6 Pengambilan Organ Jejunum.....	33
4.6.7 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease.....	33
4.6.7.1 Isolasi Protein.....	33
4.6.7.2 Pembuatan Kurva Baku Tirosin.....	34
4.6.7.3 Pengukuran Aktivitas Protease Isolasi Protein Jejunum.....	34
4.6.8 Cara pembuatan preparat histopatologi .....	35
4.6.8.1 Fiksasi.....	35
4.6.8.2 Dehidrasi dan Infiltrasi .....	35
4.6.8.3 Penjernihan (Clearing).....	35
4.6.8.4 Infiltrasi Parafin.....	36
4.6.8.5 Penanaman Jaringan ( <i>Embedding</i> ).....	36
4.6.8.6 Pewarnaan <i>Hematoksin-Eosin</i> .....	36
4.9 Analisa Data .....	37
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	38
5.1 Pengaruh Preventif Kefir Sari Kedelai Terhadap Aktivitas Protease pada Jejunum Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang Dipapar Boraks Melalui Pakan .....	38
5.2 Pengaruh Preventif Kefir Sari Kedelai Terhadap Kerusakan Gambaran Histopatologi pada Jejunum Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) yang Dipapar Boraks Melalui Pakan .....	44
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	54
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	55
<b>LAMPIRAN</b> .....	61

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
4.1 Rancangan kelompok penelitian .....	27
5.1 Aktivitas protease jejunum tikus putih ( <i>Rattus novergicus</i> ) yang diberi kefir sari kedelai dan dipapar pakan boraks .....	38
7.1 Absorbansi Larutan standar Tirosin 10 ppm .....	74
8.1 Absorbansi Larutan Standar Tirosin .....	75
8.2 Data absorbansi Tirosin .....	75
9.1 Data Konsentrasi Tirosin .....	76
9.2 Data Aktivitas Protease Jejunum Tikus .....	77
10.1 Uji Normalitas Data .....	78
10.2 Uji Homogenesitas .....	78
10.3 Uji Statistika ANOVA .....	78
10.4 Uji Lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur) .....	78
10.5 Pemberian Notasi Pada Uji BNJ .....	79



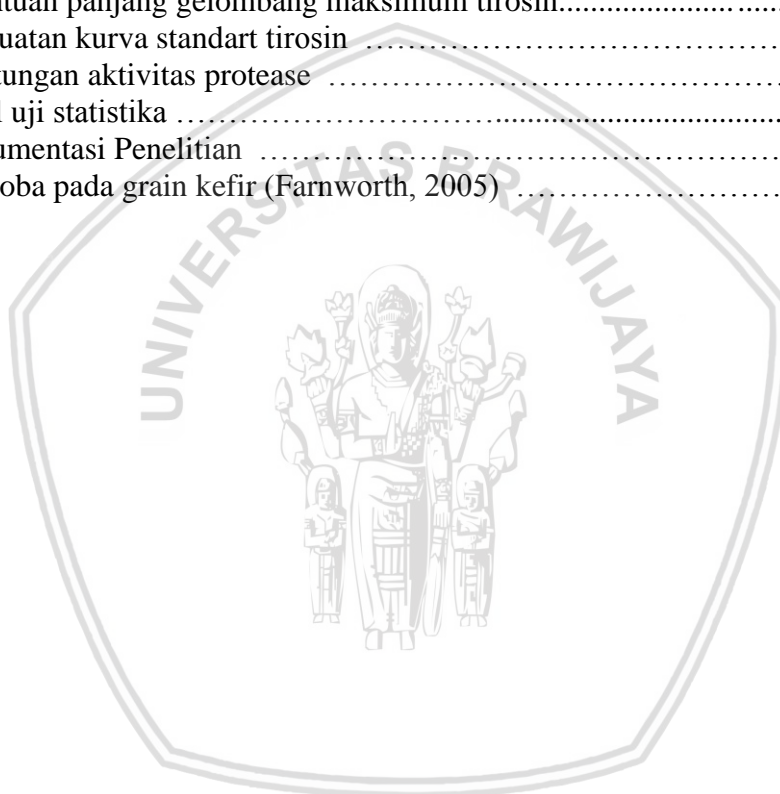
## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Reaksi senyawa-senyawa oksigen reaktif (Suryohudoyo, 1993) .....	11
2.2 Histologi jejunum normal (HE, 100x) (Mark, 2013) .....	17
2.5 Struktur Genistein (Ahmed <i>et al.</i> , 2011) .....	20
3.1 Kerangka Konseptual .....	23
5.1 Histologi vili organ jejunum tikus kontrol negatif/normal .....	46
5.2 Histopatologi vili organ jejunum tikus kontrol positif/ pakan boraks .....	46
5.3 Histopatologi vili organ jejunum tikus terapi kefir sari kedelai dosis 0,5 ml/100gBB .....	47
5.4 Histopatologi vili organ jejunum tikus terapi kefir sari kedelai dosis 1 ml/100gBB .....	47
5.5 Histopatologi vili organ jejunum tikus terapi kefir sari kedelai dosis 1,5 ml/100gBB .....	48



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Surat Keterangan Kelaikan Etik .....	62
2. Hasil uji kandungan Bakteri Asam Laktat dan Yeast pada kefir sari kedelai .....	63
3. Hasil Uji LCMS .....	64
4. Skema Kerja Penelitian .....	65
5. Proses pembuatan kefir .....	66
6. Pakan dengan boraks dan prosedur pengujian.....	68
7. Penentuan panjang gelombang maksimum tirosin.....	76
8. Pembuatan kurva standart tirosin .....	77
9. Perhitungan aktivitas protease .....	78
10. Hasil uji statistika .....	80
11. Dokumentasi Penelitian .....	82
12. Mikroba pada grain kefir (Farnworth, 2005) .....	83



## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

ANOVA	: <i>One way Analysis of Varians</i>
ATP	: <i>Adenosine Triphosphate</i>
BB	: Berat Badan
BM	: Berat Molekul
BMR	: <i>Borax Main Reagent</i>
BNJ	: Beda Nyata Jujur
cP	: <i>CentiPoise</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECM	: <i>Estra Cellular Matrix</i>
GPX	: Glutation Peroksidase
H <sub>2</sub> O	: Hidrogen dioksida/Air
HCl	: Hidrogen Klorida
HSP	: <i>Heat Shock Protein</i>
HSR	: <i>Heat Shock Respon</i>
HE	: <i>Hematoxyline Eosin</i>
KCL	: Kalium Klorida
kDa	: kilodalton
MDA	: Malondialdehyde
mL	: Mili liter
Mr	: Mobilitas <i>rate</i>
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O	: Sodium Tetraborat Dekahidrat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: Disodium Hydrogen Phosphate
NaCl	: Natrium Klorida
NAD <sup>+</sup>	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
Na-K	: <i>Natrium Kalium</i>
nn	: nanometer
PBS Azida	: Phosphat Buffer Saline azida
PBST PMSF	: Phosphat Buffer Saline Tween Phenyl Methyl Sulfonil Fluoride
Ppm	: Part per Million
Rf	: Retardation factor
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	: Rotasi per menit
SOD	: <i>Superoxide dismutase</i>
SPSS	: <i>Statistical Package for The Social Science</i>
TCA	: <i>Trichloroacetic Acid</i>
TEMED	: <i>Tetramethyl-1,2-diamino ethane</i>
μL	: mikroliter
μmol	: mikromol
°C	: derajat celcius
λ	: Lamda (panjang gelombang)

## **BAB 1 PENDAHULUAN**

### **1.1 LATAR BELAKANG**

Bahan pangan merupakan segala sesuatu yang berasal dari sumber hayati yang dapat berupa produk pertanian, produk perkebunan, produk perikanan maupun peternakan, baik yang diolah maupun tidak diolah yang ditujukan untuk memenuhi kebutuhan makanan atau minuman bagi manusia. Produk pangan asal hewan dapat berupa produk olahan maupun produk segar seperti telur, daging, dan susu. Bahan tambahan pangan adalah bahan yang ditambahkan ke dalam bahan makanan untuk mempengaruhi sifat dan bentuk dari makanan tersebut, salah satunya yaitu bahan pengawet. Penambahan bahan kimia berupa pengawet memiliki tujuan untuk memperpanjang masa simpan suatu produk yang memiliki sifat dasar yaitu cepat rusak. Akan tetapi penambahan pengawet yang digunakan terkadang tidak sesuai dengan persyaratan yang terdapat di dalam PERMENKES No.033 tahun 2012.

Berdasarkan survei keamanan pangan yang dilakukan oleh Badan POM RI (2009) pada 1.504 industri rumah tangga pangan di 18 provinsi menyebutkan bahwa terdapat penyalahgunaan bahan tambahan pangan berbahaya seperti boraks (8,80%), formalin (4,89%), rhodamin B, dan methanyl yellow (4,89%) (Biro Hukum dan Humas BPOM RI, 2013). Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Suntaka (2014) menunjukkan bahwa dari 32 sampel yang dilakukan pemeriksaan terdapat 7 sampel kios bakso (21,9%) yang terdapat di Kota Bitung Tahun 2014 positif mengandung boraks, hal ini menimbulkan kecemasan bagi masyarakat



yang akan mengkonsumsi makanan dari produk asal hewan. Secara umum fungsi boraks yang sebenarnya adalah digunakan dalam dunia industri non pangan sebagai bahan solder, bahan pembersih, pengawet kayu, antiseptik, dan pengontrol kecoa (Suhanda, 2012). Dalam beberapa tahun terakhir ini fungsi boraks disalahgunakan sebagai bahan pengawet dan pengental makanan, sedangkan boraks tersebut merupakan bahan yang sangat berbahaya bagi kesehatan tubuh, karena bersifat toksik (Saparinto dan Hidayati, 2006). Menurut PERMENKES No.033 tahun 2012 mengenai bahan tambahan pangan menerangkan bahwa senyawa asam borat dalam produk makanan dilarang digunakan sebagai bahan tambahan pangan.

Boraks yang dikonsumsi secara terus menerus maka akan menjadi sumber radikal bebas serta menimbulkan efek akumulasi negatif pada tubuh yang bersifat karsinogenik (Octavia, 2012). Menurut Krieger (2001), pemberian boraks dengan konsentrasi 10.300 ppm dalam pakan dapat menyebabkan dampak sistemik seperti degenari testis, atrofi testis, dan sterilitas pada tikus. Boraks jika masuk ke dalam tubuh melewati lambung akan bereaksi dengan asam lambung dan menjadi asam borat. Asam borat yang terbentuk di lambung akan diserap oleh vili usus dan akan masuk kedalam aliran darah, sehingga dapat menyebabkan iritasi pada mukosa vili usus. Asam borat yang masuk kedalam aliran darah akan didetoksifikasi di hepar dan diekskresikan oleh ginjal melalui urin (Airlangga, 2015). Proses detoksifikasi dari asam borat akan mengakibatkan timbulnya anemia yang akan mengeluarkan molekul Fe melalui vili usus. Molekul Fe yang bereaksi dengan

hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) akan membentuk radikal bebas yang berupa radikal bebas hidroksil ( $*OH$ ) (Ignarro, 2000).

Produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) atau radikal bebas yang tidak terkendali dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif adalah keadaan yang tidak seimbang antara antioksidan yang terdapat dalam tubuh dengan produksi ROS. ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berlebih di dalam sel akan menyebabkan aktivasi Nf-kB dan fosforilasi inhibitor Nf-kB. Selanjutnya NF-kB akan pindah menuju nukleus dan mengekspresikan sitokin pro-inflamasi seperti  $TNF\alpha$ .  $TNF\alpha$  yang diproduksi secara berlebih pada sel akan menyebabkan inflamasi. Adanya kerusakan sel seperti inflamasi akan meningkatkan aktivitas neutrofil serta pelepasan enzim protease yang menyebabkan kerusakan jaringan (Campbell *et al.*, 2006; Houser *et al.*, 2012).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Purnama dkk, (2013), menyebutkan bahwa keberadaan boraks dalam dosis toksik dapat mengakibatkan nekrosis, kongesti, serta erosi pada vili usus. Adanya radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh akan dinetralisir oleh antioksidan endogen. Antioksidan endogen merupakan antioksidan yang diproduksi oleh tubuh itu sendiri. Tetapi, apabila radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh dalam jumlah yang berlebih maka antioksidan endogen tidak mampu menetralkan radikal bebas, sehingga perlu dilakukan pemberian antioksidan eksogen untuk menangkal radikal bebas tersebut.

Kedelai merupakan sumber antioksidan eksogen yang sering dijumpai diberbagai produk makanan antara lain: tahu, tempe, kecap, sari kedelai, dan produk fermentasi sari kedelai. Sari kedelai adalah hasil ekstraksi kedelai oleh air. Sari kedelai merupakan minuman yang mengandung gizi tinggi sebagai sumber protein, vitamin B dan isoflavon. Isoflavon memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang dapat menetralkan senyawa radikal bebas yang disebabkan oleh paparan zat toksik. Menurut Kesenkas *et al.* (2010), proses fermentasi dari suatu bahan pangan yang mengandung antioksidan dapat meningkatkan daya antioksidan di dalam bahan pangan tersebut. Salah satu produk yang dapat diperoleh dari hasil fermentasi sari kedelai adalah kefir. Terdapat beberapa zat antioksidan yang telah terbukti diproduksi oleh kedelai selama proses fermentasi, yaitu *3-hydroxyanthranilic acid*, *2,3-Dihydroxybenzoic acid*, *8-hydroxidaidzein*, dan *8-hydroxygenistein* (Liu, *et al.*, 2005).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui manfaat kefir sari kedelai sebagai sumber antioksidan dan pengaruhnya terhadap vili usus khususnya jejunum akibat dari makanan yang telah tercemar boraks serta pengaruhnya terhadap aktivitas protease dan gambaran histopatologi jejunum tikus (*Rattus novergicus*).

## 1.2 RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut :

- 1) Apakah pemberian kefir sari kedelai dapat mencegah peningkatan aktivitas protease pada jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar boraks melalui pakan?
- 2) Apakah pemberian kefir sari kedelai dapat mencegah kerusakan histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar boraks melalui pakan?

## 1.3 BATASAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

- 1) Tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan berasal dari Laboratorium Biologi Universitas Brawijaya Malang strain *Wistar* sejumlah 20 ekor, jenis kelamin jantan, berumur 8-12 minggu, berat badan 180-200 gram dan penggunaan hewan cobapada penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian (KEP) Universitas Brawijaya No: 421-KEP-UB (Lampiran 1).
- 2) Hewan model dibuat dengan pemberian pakan yang telah dicampur boraks dengan konsentrasi 10.300 ppm boraks selama 21 hari (Krieger, 2001).
- 3) Kefir sari kedelai 5% dibuat dengan perbandingan 2 liter sari kedelai : 100 gram grain kefir. Sari kedelai yang digunakan didapatkan dari industri sari kedelai rumah tangga di Malang serta grain kefir yang terdiri dari 18 jenis

*Lactobacilli*, 5 jenis *Lactococci*, 3 jenis *Streptococci*, 12 jenis *yeast*, dan 2 jenis *Acetobacter* yang didapatkan dari Subi Kefir Malang.

- 4) Boraks yang digunakan merupakan *sodium tetraboraks dekahidrat* yang didapatkan dari Panadia *Laboratory* Malang dalam bentuk serbuk teknis.
- 5) Volume pemberian kefir sari kedelai yaitu sebanyak 0,5 ml/100 gram BB, 1 ml/100 gram BB, dan 1,5 ml/100 gram BB diberikan dengan cara sonde lambung (Hrapkiewicz *et al*, 2013).
- 6) Variabel yang diamati dalam penelitian ini berupa histopatologi jejunum pewarnaan *Hematoksilin – Eosin* dan aktivitas protease jejunum yang diukur dengan metode spektrofotometri.

#### 1.4 TUJUAN PENELITIAN

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1) Mengetahui efek preventif pemberian kefir sari kedelai dalam mencegah peningkatan aktivitas protease pada jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar boraks melalui pakan.
- 2) Mengetahui efek preventif pemberian kefir sari kedelai dalam mencegah kerusakan histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar boraks melalui pakan.

#### 1.5 MANFAAT PENELITIAN

Melalui penelitian ini diharapkan dapat dibuktikan bahwa kefir sari kedelai memiliki peran sebagai antioksidan dalam mencegah kerusakan jejunum melalui gambaran histopatologi dan aktivitas protease jejunum tikus putih (*Rattus*

*norvegicus*) yang dipapar boraks melalui pakan dan sebagai sumber informasi mengenai efektivitas kefir sari kedelai, sehingga kefir sari kedelai dapat digunakan sebagai alternatif antioksidan.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Boraks

#### 2.1.1 Pengertian Boraks

Boraks adalah senyawa kimia turunan dari logam berat boron (B). Nama lain dari boraks yaitu boraks dekahidrat, sodium tetraboraks dekahidrat, dan boraks 10. Boraks yang memiliki nama senyawa sodium tetraborat dekahidrat merupakan senyawa kimia yang memiliki rumus molekul  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  berbentuk kristal putih, tidak berbau dan stabil pada suhu dan tekanan normal (Khamid, 2006). Boraks memiliki berat molekul 381,43 dan mempunyai kandungan boron sebesar 11,34 %. Boraks termasuk turunan dari logam berat boron (B), berbentuk kristal dan serbuk tak berwarna, tidak berbau, bersifat basa lemah dengan pH (9,15-9,20), dan sangat larut dalam air panas (EPA, 2008)

#### 2.1.2 Kegunaan Boraks

Boraks akan terurai jika dalam keadaan panas dengan membentuk natrium metaborat, boron oksidan, dan air (Hamer and Janet, 2004). Boraks maupun asam borat memiliki sifat antiseptik dan biasa digunakan oleh industri farmasi sebagai ramuan obat, misalnya dalam salep, bedak, dan larutan kompres. Selain itu boraks juga digunakan sebagai bahan solder, pembuatan gelas, bahan pembersih/pelicin porselin, pengawet kayu, antiseptik kayu, dan pengontrol kecoa (Aminah dan Himawan, 2009).



### 2.1.3 Efek Boraks Pada Tubuh

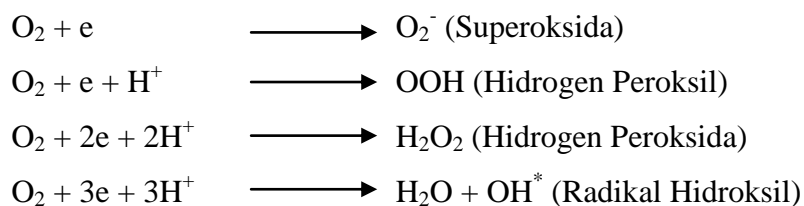
Boraks memiliki efek buruk bagi tubuh, salah satunya adalah sebagai racun bagi sel tubuh. Menurut Dourson *et al.*, (2003), bahaya yang dapat ditimbulkan akibat pengaruh boraks secara langsung maupun residu yang ditinggalkan dapat berdampak sistemik pada tubuh. Efek yang ditimbulkan boraks terhadap organ tubuh bergantung pada banyaknya dosis serta konsentrasi yang masuk kedalam tubuh. Efek jangka panjang dari penggunaan boraks dapat menyebabkan merah pada kulit, gagal ginjal, iritasi pada mata, iritasi pada saluran respirasi, gangguan kesuburan dan janin (Adinugroho, 2013). Dampak boraks yang dapat ditimbulkan lainnya yaitu anoreksia, muntah, diare, gastrointestinal, nyeri abdominal, penurunan berat badan, ruam kulit, anemia, konvulsi, depresi, dehidrasi, kerontokan rambut, degenerasi atau pengecilan hati, oedema pada otak, dan penimbunan cairan pada organ tubuh (Pongsavee, 2009).

### 2.1.4 Patomekanisme Boraks

Boraks masuk ke dalam tubuh dapat melalui beberapa cara, salah satunya adalah melalui sistem pencernaan. Boraks yang masuk ke dalam tubuh lewat sistem pencernaan akan diserap oleh usus dan selanjutnya akan disimpan terus menerus secara kumulatif dalam organ tubuh seperti hepar, otak, ginjal, atau testis hingga akhirnya dosis toksin dari boraks semakin tinggi dalam tubuh. Boraks tidak dimetabolisme di dalam tubuh, karena diperlukan energi yang besar untuk dapat memecah ikatan antara oksigen dengan boron (B-O-B) (Adinugroho, 2013).

Boraks dalam bentuk asam borat tidak dapat terdisosiasi sehingga akan terdistribusi pada semua jaringan tubuh. Apabila dosis toksin boraks telah melebihi batas maksimal maka akan mengakibatkan efek kerusakan pada jaringan tubuh. Menurut Dieter dalam Purnama (2013), zat kimia boraks yang masuk ke dalam sistem pencernaan dapat terabsorpsi oleh vili usus dan akan mengakibatkan ulserasi gastrointestinal yang berdampak pada pemendekan bahkan kehilangan vili *duodenum*, *jejunum*, maupun *ileum*.

Boraks yang masuk kedalam tubuh akan mendorong tumbuhnya *reactive oxygen species* (ROS). Asam borat yang terbentuk di dalam lambung bersifat sitotoksik dengan mekanisme kerja sebagai penghambat pembentukan ATP (Kaspul, 2010). Penurunan ATP ini dikarenakan asam borat yang terbentuk akan menghambat kerja enzim sitokrom oksidase. Pada mitokondria  $O_2$  85-90 % akan dimetabolisme untuk pembentukan ATP. Pembentukan ATP merupakan hasil oksidasi dari makanan yang masuk ke dalam tubuh. Dimana hal ini elektron H dari NADH dan FADH yang dibawa oleh sitokrom akan dipindahkan dari satu substrat ke substrat lain secara berantai. Setiap kali dipindahkan, energi yang terlepas akan digunakan untuk mengikat fosfat anorganik dan molekul ADP sehingga terbentuk ATP. Pada proses ini penangkapan elektron oleh  $O_2$  akan direduksi menjadi  $H_2O$ . Apabila pengalihan elektron tersebut tidak terjadi secara sempurna maka pembentukan ATP juga tidak sempurna, sehingga akan terbentuk senyawa oksigen reaktif (ROS), salah satunya yaitu radikal hidroksil. pada reaksi tersebut terjadi pengalihan 4 elektron secara bertahap yaitu :



**Gambar 2.1** Reaksi senyawa-senyawa oksigen reaktif (Suryohudoyo, 1993)

Radikal bebas atau *reactive oxygen species* (ROS) merupakan dampak yang ditimbulkan boraks ketika masuk ke dalam tubuh. ROS merupakan molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak memiliki pasangan pada kulit terluarnya. Radikal bebas memiliki sifat yaitu tidak stabil, sangat reaktif, dan dapat merebut elektron dari molekul lain dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya (Astuti, 2008). Dalam teori, molekul radikal bebas akan menarik elektron makromolekul biologis yang berada di sekitarnya yang dapat berupa protein, asam nukleat, dan asam deoksiribonukleat (DNA), hal ini bertujuan agar radikal bebas mendapatkan elektron berpasangan. Astuti (2008) menyebutkan bahwa jika makromolekul yang teroksidasi dan terdegradasi merupakan bagian dari sel atau organel, maka dapat mengakibatkan kerusakan pada sel tersebut.

Mekanisme perusakan jaringan jejunum yang telah terpapar boraks terjadi karena ROS mampu merusak lipid dan protein yang merupakan komponen utama penyusun sel dalam jaringan. Proses perusakan lipid penyusun membran sel oleh ROS ini dinamakan proses oksidasi lipid. Mekanisme oksidasi lipid terdiri dari tiga tahapan utama, yakni inisiasi, propagasi, dan terminasi. Pada tahap inisiasi, terjadi interaksi antara radikal bebas dengan *polyunsaturated fatty acid* dari membran fosfolipid. Proses ini dapat berlangsung karena adanya produksi radikal superoksida ( $\text{O}_2^*$ ), hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2^*$ ), dan radikal hidroksil ( $\text{OH}^*$ ) yang

berlebih. Terjadi pembentukan radikal asam lemak yaitu suatu senyawa turunan asam lemak yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat kehilangan satu atom hidrogen. Pada tahap propagasi, radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi. Radikal peroksi akan menyerang asam lemak dan menghasilkan hidroperoksida dan radikal asam lemak baru. Reaksi dapat berhenti (terminasi) apabila menghasilkan produk non radikal hasil kombinasi dua senyawa radikal (Mahdi, 2010). Tahapan terminasi menunjukkan bahwa sesama radikal dapat bergabung menjadi molekul yang tidak reaktif atau bereaksi dengan senyawa antioksidan setelah terbentuk (Silalahi, 2001).

Efek negatif dari radikal bebas akan timbul jika jumlah radikal bebas melebihi kemampuan detoksifikasi sistem pertahanan antioksidan endogen sehingga menimbulkan kondisi stres oksidatif. Stres oksidatif merupakan suatu kondisi yang dapat menyebabkan peningkatan laju kerusakan sel akibat induksi oksigen dan turunannya seperti ROS. Mahdi (2010) menyebutkan bahwa stress oksidatif yang terjadi secara terus menerus dan dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif, yaitu terjadinya kerusakan dan kematian sel, jaringan hingga organ tubuh. Sel yang mengalami kerusakan diakibatkan oleh adanya kondisi yang tidak seimbang antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan (Fuji, *et al.*, 2013 ; Lee, *et al.*, 2004). Pembentukan radikal bebas yang disebabkan oleh boraks akan dinetralkan oleh antioksidan yang terdapat di dalam tubuh dalam jumlah yang berimbang. Antioksidan yang dimaksud berupa enzim, diantaranya adalah enzim *superoxide*

*dismutase* (SOD) yang terdapat di mitokondria dan sitosol, *glutathione peroxidase* (GPX), *glutathione reductase*, dan katalase (Astuti, 2008).

## 2.2 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan coba atau hewan laboratorium merupakan hewan yang khusus dikembangkan untuk keperluan penelitian biologik. Hewan laboratorium dipergunakan sebagai model dalam penelitian yang berkaitan dengan pengaruh obat atau bahan kimia pada manusia. Tikus merupakan spesies ideal untuk dijadikan sebagai hewan coba dalam uji toksikologi karena berat badannya dapat mencapai 500 gram. Dengan ukuran tubuh yang cukup besar, maka organ tubuh tikus pun relatif besar sehingga materi dari perlakuan apapun dapat diberikan dengan mudah melalui berbagai rute. Reaksi yang ditunjukkan tikus pada umumnya serupa dengan yang terjadi pada mencit, anjing, dan kera yang juga sering digunakan untuk uji toksikologi (Kusumawati, 2004).

Dalam sebuah penelitian untuk pengujian toksikologi, terdapat beberapa macam golongan pengujian, salah satunya yaitu uji toksikologi umum yang mencakup uji toksikologi akut, subakut, dan kronis serta uji toksikologi khusus yang memiliki tujuan untuk mengetahui efek khusus akibat dari pemberian bahan kimia tertentu. Keberhasilan hasil uji toksikologi suatu bahan dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya meliputi faktor bahan toksik, hewan coba, teknik, dan prosedur, sehingga perlu adanya pemahaman khusus terhadap berbagai faktor tersebut, agar resiko yang diterima menjadi seminimal mungkin (Kusumawati, 2004).

Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) menurut Krinke (2000) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia  
Phylum : Chordata  
Sub Phylum : Vertebrata  
Classis : Mammalia  
Ordo : Rodentia  
Famili : Muridae  
Genus : Rattus  
Spesies : *Rattus norvegicus* L.

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan sebagai hewan percobaan, berbeda dengan hewan laboratorium lainnya. Salah satu sifat fisiologisnya yaitu tikus tidak dapat muntah karena memiliki struktur anatomi tidak lazim pada tempat yang bermuara dari esofagus ke dalam lambung sehingga mempermudah proses pencekakan perlakuan menggunakan sonde lambung.

Menurut Mutiyani (2005), tikus dengan umur 6-8 minggu masih belum dipengaruhi oleh hormon-hormon pertumbuhan dan seksual. Pemilihan tikus dengan jenis kelamin jantan pada beberapa penelitian dikarenakan tikus jantan dapat memberikan hasil penelitian yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi oleh siklus menstruasi dan kehamilan seperti pada tikus betina (Sugiyanto, 1995). Menurut Faridah dkk (2011), kondisi hormonal tikus jantan relatif stabil sehingga tidak banyak mempengaruhi metabolisme tubuh.



Tikus juga tidak memiliki kelenjar empedu, lambung terdiri atas bagian glandular dan nonglandular, serta usus yang terdiri atas duodenum, jejunum, dan ileum. Lama hidup tikus berkisar antara 2,5 sampai 3 tahun dengan berat badan umum tikus jantan dewasa berkisar antara 300 samapai dengan 400 gram dan betina 250 sampai 300 gram, dengan kebutuhan air dan makanan sebanyak 8-11ml/100g BB dan 5g/100g BB. Tikus memasuki masa pubertas pada umur 50-60 hari dan panjang masa bunting selama 21-23 hari (Kusumawati, 2004).

### **2.3 Hubungan Aktivitas Protease terhadap Dampak Pemberian Boraks**

Enzim proteolitik atau protease merupakan suatu enzim yang berperan penting dalam pencernaan, yaitu berfungsi sebagai penyederhana molekul protein dengan menghidrolisis ikatan peptide pada protein (Nuraini, 2002). Peran dari enzim protease yaitu untuk membersihkan jaringan luka yang mengalami nekrosis serta membunuh bakteri pada jaringan yang mengalami peradangan. Enzim protease juga berperan dalam metabolisme dan proses regulasi sel hewan, tumbuhan, mikroorganisme serta fungsi fisiologis sistem imun dan inflamasi (Naiola dan Widyastuti, 2007). Enzim protease yang terlibat dalam kerusakan jaringan adalah protease serin (elastase neutrofil) yaitu jenis protease yang tersimpan dalam neutrofil yang berfungsi sebagai pertahanan antimikroba dengan mekanisme penelanan mikroorganisme di dalam fagolisosom neutrofil (Segal, 2005).

Kerusakan sel yang disebabkan oleh zat toksik yang terdapat pada boraks terbukti dapat menimbulkan stres oksidatif pada vili usus yang disebabkan oleh adanya peningkatan ROS yaitu radikal bebas hidroksil ( $\text{OH}^*$ ) (Purnama, 2013 ;



Airlangga, 2015). Dengan adanya peningkatan ROS atau radikal bebas maka akan menyebabkan aktivasi Nf-kB dan fosforilasi inhibitor NF-kB (IkB), sehingga NF-kB berpindah ke nukleus dan mengekspresikan TNF $\alpha$ . Produksi TNF $\alpha$  berlebih pada sel yang mengalami kerusakan akan menyebabkan aktivasi neutrofil dan pelepasan enzim protease atau meningkatkan aktivasi protease (Khumar *et al.*, 2006).

#### 2.4 Histopatologi Usus (Jejunum)

Usus halus merupakan bagian saluran pencernaan yang sangat penting karena di dalamnya terjadi proses pencernaan bahan pakan dan ditempat tersebut pula terjadi proses penyerapan sari makanan. Usus halus terbagi dalam tiga bagian yaitu duodenum, jejunum, dan ileum (Arya dkk, 2012). Jejunum merupakan bagian terpanjang dari usus halus yang menghasilkan beberapa enzim pencernaan. Jejunum memiliki ukuran vili lebih tipis, lebih kecil dan jumlahnya lebih sedikit daripada duodenum. Secara umum, struktur utama usus halus adalah membran mukosa, lamina propia, submukosa, jaringan limfatik, lapisan serosa dan muskuler. Sel epitel menutupi seluruh permukaan bebas dari membran mukosa dan berbentuk epitel kolumnar selapis (Xu and Cranwell, 2003). Bagian dari usus halus, yaitu jejunum yang tersusun atas sel-sel yang menghasilkan beberapa enzim intraseluler (endoenzim) yang membantu proses pencernaan. Umumnya enzim – enzim ini dihasilkan pada bagian – bagian sel yang mukosanya dapat bekerja apabila terjadi pengelupasan ataupun lisis pada mukosa (Natalie *et al.*, 2000).



**Gambar 2.2** Histologi jejunum normal (HE, 100x) (Mark, 2013).

Histopatologi jejunum yang terpapar zat toksik seperti boraks akan mengalami kerusakan pada vili dan lapisan mukosa. Pada jaringan jejunum yang terpapar zat toksik terdapat adanya peningkatan tinggi villus, infiltrasi sel radang, peningkatan jumlah sel goblet, dan *distortion* lapisan sel epitel (Elbakary, 2014). Adanya infiltrasi sel radang terjadi ketika terdapat infiltrasi leukosit dalam jumlah yang sedikit dan didominasi oleh neutrofil. Selain itu lamina propia juga mengalami perubahan dengan tampak adanya pemendekan dan bentuk yang tidak teratur. Menurut Purnama dkk., (2013) Teringestinya bahan aktif boraks yakni asam borat ke dalam sistem pencernaan akan terabsorpsi oleh vili usus dan dapat mengakibatkan ulserasi gastrointestinal yang dapat berdampak pada pemendekan bahkan kehilangan vili duodenum, jejunum, maupun ileum.

## 2.5 Kefir Sari Kedelai

### 2.5.1 Definisi

Sari kedelai adalah salah satu susu dari hasil ekstraksi air terhadap biji kedelai (Dadhak *et al.*, 2011). Sari kedelai merupakan sumber protein yang murah dan memiliki kandungan nutrisi yang penting. Menurut Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (2008), menyatakan bahwa mutu protein sari kedelai 80% dari susu sapi, tetapi tidak mengandung kolesterol dan tidak menyebabkan alergi, sehingga dapat dikonsumsi oleh penderita lactose intolerance.

Kefir merupakan salah satu produk fermentasi susu yang memiliki kekentalan seperti krim serta mempunyai rasa asam dan beralkohol. Secara tradisional, kefir diproduksi dengan menambahkan grain kefir (massa protein, polisakarida, *Streptococci* asam laktat mesofilik, homofermentatif dan heterofermentatif, bakteri asam laktat dan jamur) ke dalam sejumlah susu. Menurut Hidayati dkk (2006), starter kefir terdiri dari BAL dan khamir yang berperan dalam pembentukan cita rasa dan struktur kefir. Kefir dapat dibuat dari susu kambing, susu sapi maupun susu yang terbuat dari kacang-kacang, salah satunya adalah sari kedelai. Perbandingan antara granula kefir dan susu dapat mempengaruhi hasil fermentasi yang berupa pH, viskositas, dan profil mikrobiologi kefir. Perbandingan antara granula kefir dengan susu optimalnya adalah 1 : 30 sampai 1 : 50 (Farnworth, 2005)

Menurut Farnworth (2005), granula kefir memiliki warna putih agak kekuningan, berlobus, lembut, dan agak tidak beraturan karena mengandung polisakarida serta tersusun atas *yeast* dan beberapa genus bakteri utama

diantaranya *Lactobacilus*, *Latococci*, *streptococci*, dan *Acetobacter*. Selama proses fermentasi berlangsung, homofermentative asam laktat *streptococci* berkembang dengan cepat sehingga mengakibatkan penurunan pH. Dalam keadaan pH rendah, *Lactobacilli* akan semakin tumbuh namun tumbuhnya *Lactobacilli* dapat mengakibatkan penurunan dari jumlah *Streptococci*. Adanya yeast dalam granula kefir akan memacu tumbuhnya *Streptococci* heterofermentatif yang dapat memproduksi aroma khas fermentasi.

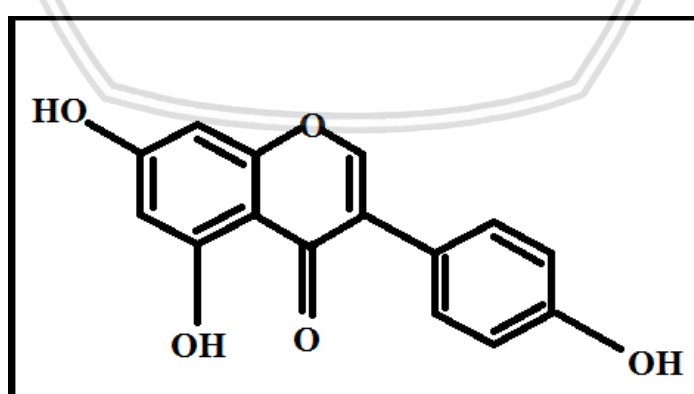
Ketika terjadi fermentasi, pertumbuhan bakteri asam laktat akan didorong oleh adanya yeast dan bakteri asam asetat. Selain itu, peptida dan eksopolisakarida yang terbentuk akan memiliki sifat bioaktif (Farnworth, 2005). Menurut hasil penelitian sebelumnya mengemukakan bahwa sari kacang kedelai dapat digunakan sebagai bahan baku dalam fermentasi kefir. Menurut Fratiwi dkk (2008), menyatakan bahwa hasil fermentasi kefir sari kacang kedelai memiliki kadar asam laktat sebesar 0,36%, nilai viskositas 516,250 Cp, dan nilai alkohol sebesar 1,31%. Sari kedelai yang difermentasi akan banyak mengandung aglikogen fenolik yang lebih aktif serta lebih mudah diserap daripada  $\beta$ -glikosida yang terdapat pada sari kedelai yang tidak dilakukan proses fermentasi (McCue and Shetty, 2004).

### 2.5.2 Aktioksidan dalam Kefir Sari Kedelai

Antioksidan adalah senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu fungsinya dan dapat memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas (Kumalaningsih, 2006). Terdapat tiga macam antioksidan yaitu antioksidan yang diproduksi oleh tubuh

berupa enzim seperti superoksida dismutase, *glutathione peroxidase*, *peroxidase*, dan katalase. Antioksidan alami yang dapat diperoleh dari tanaman dan hewan seperti tokoferol, vitamin C, betakaroten, flavonoid, dan senyawa fenolik. Antioksidan sintetis yang dibuat dari bahan kimia seperti BHA, BHT, TBHQ, PG, dan NDGA yang biasa ditambahkan dalam makanan untuk mencegah kerusakan lemak (Kumalaningsih, 2006).

Senyawa antioksidan yang terdapat dalam biji kedelai adalah isoflavon. Isoflavon pada kedelai terdapat dalam empat bentuk, yaitu bentuk aglikon / tanpa gula (genistein, daidzein, dan glycitein), bentuk glikosida (daidzin, genistin, dan glisitin), bentuk asetilglikosida, dan bentuk malonilglikosida. Isoflavon utama pada kedelai terdiri dari genistein dan daidzein, turunan  $\beta$ -glikosida, gensitin, dan daidzin, serta senyawa isoflavon lainnya seperti glycitein dan glikosidanya (Astuti, 2008). Genistein mempunyai struktur kimia yang ditampilkan pada Gambar 2.5.



**Gambar 2.5:** Struktur Genistein (Ahmed *et al.*, 2011)

## 2.6 Mekanisme Kerja Antioksidan pada Kefir Sari Kedelai

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, mencegah proses oksidasi lipid. Mekanisme kerja antioksidan yaitu dengan melindungi komponen yang bersifat tak jenuh (mempunyai ikatan rangkap) terutama lemak. Lemak adalah komponen utama dalam membran sel. Menurut Valko *et al.* (2006), radikal bebas cenderung berikatan dengan senyawa lain untuk membentuk senyawa yang stabil dan mampu merusak makromolekul, seperti lipid membran sel, DNA dan protein yang menyebabkan stres oksidatif.

Mekanisme kerja antioksidan yang terdapat pada sel secara umum adalah dengan menghambat oksidasi komponen sel (lemak, protein, DNA). Dengan berperan sebagai antioksidan, isoflavon mempunyai kemampuan untuk mencegah terjadinya peroksidasi lipid. Dalam hal ini, isoflavon berfungsi sebagai antioksidan primer karena berperan sebagai akseptor radikal bebas sehingga dapat menghambat reaksi rantai radikal bebas pada oksidasi lipid. Isoflavon memiliki kemampuan untuk mendonorkan atom hidrogen sehingga terbentuk senyawa yang lebih stabil dan terbentuk radikal fenoksil yang kurang reaktif (Oteiza *et al.*, 2005).

Isoflavon dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida ( $R^*$ ,  $ROO^*$ ) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan ( $A^*$ ) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Selain sebagai pendonor atom hidrogen, isoflavon juga dapat menghambat atau



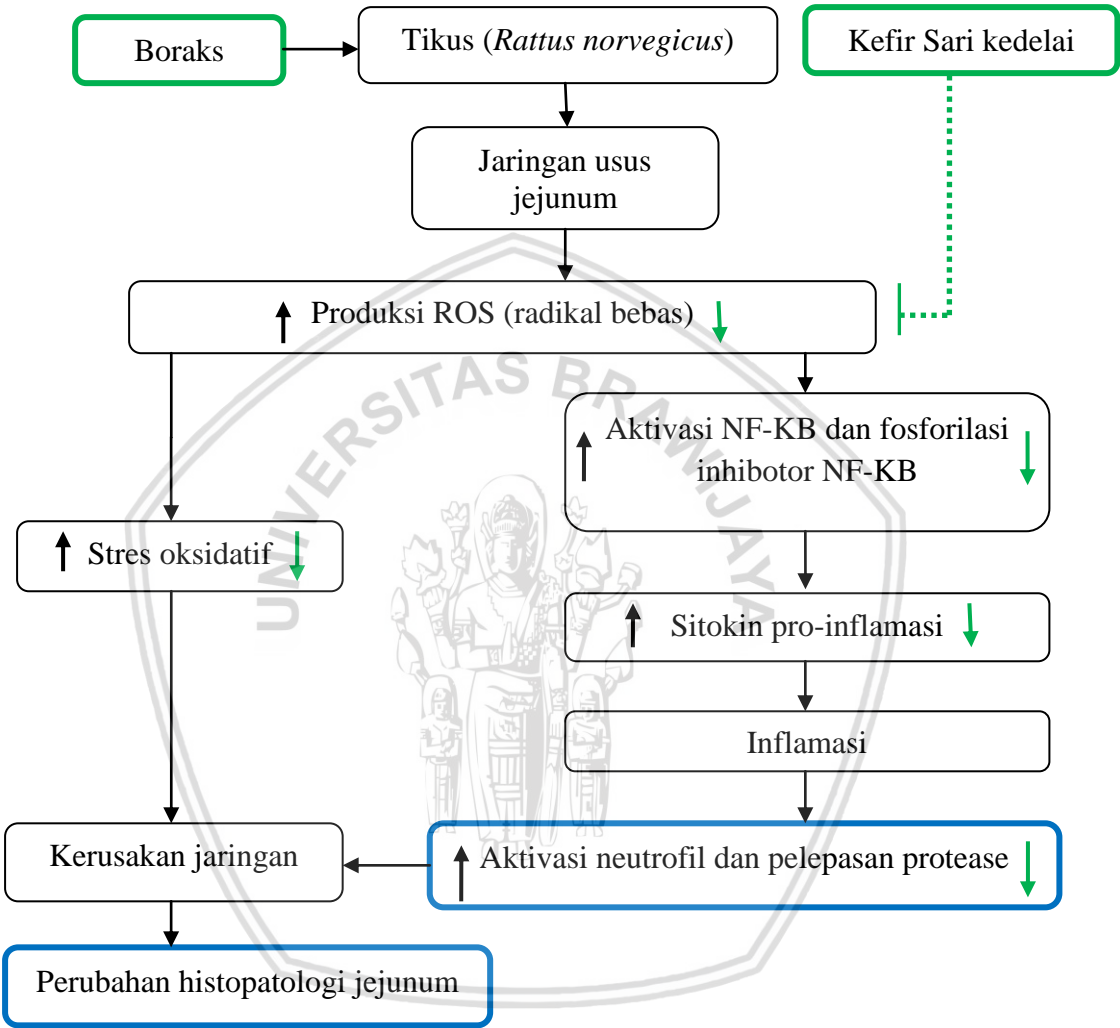
mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak, sehingga dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Radikal antioksidan ( $A^*$ ) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk bereaksi dengan molekul lipida lain dan membentuk radikal lipida baru.





### BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

**Keterangan :**

- : Variabel bebas
- ↑ ↓ : Naik
- ↓ ↑ : Turun
- : Variabel tergantung
- : Patomekanisme
- .....| : Menghambat

Pemberian senyawa kimia boraks melalui pakan pada tikus *Rattus norvegicus* akan menyebabkan produksi ROS yang berlebihan dalam sel. Boraks masuk ke dalam tubuh dan bereaksi dengan air akan terurai menjadi natrium hidroksida dan asam borat. Asam borat merupakan senyawa zat toksik yang dapat menghambat pembentukan ATP dan berdampak pada pembentukan senyawa oksigen reaktif. Oksigen reaktif yang terlepas menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan endogen sehingga menimbulkan stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan jejunum. Produksi ROS yang berlebihan dalam sel menyebabkan aktivitas NF- $\kappa$ B dan fosforilasi inhibitor NF- $\kappa$ B. Kemudian NF- $\kappa$ B berpindah menuju nukleus dan mengekspresikan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  dalam jumlah berlebih yang terdapat pada sel akan menyebabkan terjadinya inflamasi. Adanya inflamasi akan meningkatkan aktivitas neutrofil serta pelepasan enzim protease.

Kefir sari kedelai mengandung senyawa isoflavon yang merupakan antioksidan untuk mencegah terbentuknya ROS serta timbulnya efek dari radikal bebas yang berlebihan dengan cara mendonasikan atom hidroksil. Dengan adanya donor atom hidroksil maka aktivasi NF- $\kappa$ B dan fosforilasi inhibitor NF- $\kappa$ B serta sitokin pro-inflamasi seperti TNF $\alpha$  dapat diminimalisir. Ketika proses inflamasi dalam keadaan minimal maka aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim protease menjadi rendah sehingga terjadi penghambatan kerusakan terhadap gambaran histopatologi jejunum.

Selain itu kefir sari kedelai yang mengandung senyawa antioksidan ini dapat mencegah pembentukan radikal bebas melalui penguraian senyawa non radikal

seperti  $H_2O_2$  dan menangkap radikal oksigen yang dibentuk oleh adanya reaksi peroksida lipid dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas. Terputusnya reaksi peroksidasi lipid ini akan menurunkan radikal lipida yang dapat merusak jaringan jejunum tikus sehingga kerusakan sel yang lebih parah dapat dicegah. Adanya penurunan radikal bebas maka kerja antioksidan eksogen dapat diimbangi dengan antioksidan endogen dalam mencegah akumulasi zat toksik yang berada dalam tubuh. Ketika antioksidan yang terdapat di dalam tubuh mengalami peningkatan maka dapat mengurangi keadaan stres oksidatif sehingga metabolisme dan regenerasi sel dapat berjalan lancar.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat disusun adalah sebagai berikut : Kefir sari kedelai dapat mencegah kenaikan aktivitas protease dan mencegah kerusakan jejunum dengan melihat histopatologi pada jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar boraks melalui pakan.

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Februari 2015 sampai bulan Juli 2015. Tempat penelitian meliputi Laboratorium Fisiologi Hewan Gedung BJ Habibie Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.

### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus antara 150-200 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

$$p(n-1) \geq 15$$

Keterangan : p = jumlah kelompok

$$5(n-1) \geq 15$$

n = jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk perlakuan sejumlah 5 kelompok maka minimal dilakukan 4 kali ulangan, maka diperlukan 20 ekor tikus.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dipergunakan apabila media yang dipergunakan dalam penelitian sama atau dianggap seragam (Kusriningrum, 2008). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, dengan uraian sebagai berikut : kelompok pertama sebagai kontrol negatif, yaitu diberikan pakan standar tanpa perlakuan pemberian kefir sari kedelai (A), kelompok kedua sebagai kontrol positif yang diberi pakan mengandung boraks tanpa perlakuan pemberian kefir sari kedelai (B), kelompok ketiga, keempat, dan kelima dipapar dengan boraks melalui pakan dan diberikan kefir sari kedelai 5% berturut-turut sebanyak 0,5 ml/100gBB (C), 1 ml/100gBB (D), dan 1,5 ml/100gBB tikus (E) selama 3 minggu. Tikus dikandangkan dalam bak plastik secara individu dengan ukuran bak plastik yaitu 17,5 x 23,75 x 17,5 cm. Rancangan kelompok penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.1.** Rancangan Kelompok Penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan			
	1	2	3	4
Aktivitas protease dan histopatologi jejunum				
Kelompok A (kontrol negatif)				
Kelompok B (kontrol positif boraks)				
Kelompok C (boraks + terapi kefir 0,5 ml/100gBB)				
Kelompok D (boraks + terapi kefir 1 ml/100gBB)				
Kelompok E (boraks + terapi kefir 1,5 ml/100gBB)				

#### 4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : pemberian sediaan pakan mengandung boraks dan kefir sari kedelai.
- Variabel terikat : aktivitas protease dan gambaran histopatologi jejunum
- Variabel kontrol : jenis kelamin, umur, berat badan tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar, kandang dan air minum.

#### 4.5 Alat dan Bahan

##### 4.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : kandang tikus berupa bak plastik dan tutup kandang dari kawat, botol minum tikus, tempat makan tikus, sonde, toples kaca, lemari pemanas, alat penyemprot, termometer, *bekker glass*, saringan, pH meter digital, *dissecting set*, mortar, aluminium foil, sarung tangan, timbangan digital, gelas ukur, penangas air, pengaduk kaca, seperangkat alat sentrifugasi, lemari pendingin, mikropipet, *blue tip*, vortex, *yellow tip*, gelas objek, *cover glass*, mikroskop cahaya (Olympus BX51), tabung eppendorf, *water bath*, tempat organ, *cover glass*, dan spektrofotometer.

##### 4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar, sekam kayu, plastik, sari kedelai, gula, grain kefir, alkohol 70%, pakan tikus standar, Boraks (sodium tetraboraks dekahidrat), Formaldehyde, larutan PBS – Tween, Tris – HCl, pasir kuarsa, larutan PSMF, PBS – Azida, *ethanol absolute*, aquades, NaCl, KCl, PFA 4%, NaCl Fisiologis

0,95%, larutan tirosin, kasein, buffer fosfat, *Tri Chloro Acetic Acid* (TCA), HCl 1 N, parafin, xylol, dan Pewarnaan jaringan *Hematoxyline Eosin*.

## **4.6 Tahapan Penelitian**

### **4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan**

Hewan coba tikus dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dan setiap kelompok perlakuan terdapat 4 tikus. Sebelum mendapatkan perlakuan, tikus diaklimatisasi dengan kondisi laboratorium selama 7 hari dengan diberi pakan dan minum secara *ad libitum* serta dilakukan pemberian sekat ditiap kandang tikus agar setiap tikus ditempatkan pada satu kandang tertutup. Pemberian pakan selama masa adaptasi berupa pakan standar yaitu pakan konsentrat dengan komposisi air maksimal 12%, protein kasar minimal 16%, lemak kasar 3-7%, serat kasar maksimal 8%, abu maksimal 10%, kalsium 0,9-1.2%, dan fosfor 0,6-1%. Tikus dikandangkan pada suhu optimum ruangan yaitu sekitar 22-24<sup>0</sup>C dan kelembaban udara 50 – 60% dengan ventilasi yang cukup (AOAC, 2005).

### **4.6.2 Penentuan Dosis Kefir dan Dosis Boraks**

Penentuan dosis boraks yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada hasil temuan pada penelitian *Weir and Fisher* yang menyatakan bahwa paparan borak dengan konsentrasi 10.300 ppm boraks pada diet pakan tikus dapat menimbulkan efek toksik pada organ dan saluran reproduksi tikus yang berupa atrofi total pada testis (Krieger, 2001).

Volume pemberian kefir sari kedelai 5% yang diberikan kepada tikus yang dipapar boraks yaitu sebanyak 0,5 ml/100gBB, 1 ml/100gBB, dan 1,5 ml/gBB



dengan dasar pertimbangan bahwa volume maksimal pemberian terapi secara per oral pada tikus adalah sebesar 2 ml/100gBB.

#### **4.6.3 Pembuatan Sediaan Pakan Mengandung Boraks dan Cara Pemaparan Pada Hewan Coba**

Dalam pembuatan 1 kg pakan yang mengandung boraks dengan konsentrasi 10.300 ppm boraks dibutuhkan aquades sebanyak 700 ml yang bertujuan sebagai bahan perekat senyawa boraks pada pakan tikus. Kadar boraks yang memiliki konsentrasi 10.300 ppm boraks dibuat dengan cara melarutkan 10,407 g serbuk boraks teknis kedalam 700 ml akuades steril kemudian dicampurkan ke dalam 1 kg pakan. Setelah tercampur sempurna dikeringkan melalui proses pengovenan dengan suhu 120°C selama 5 jam. Penambahan aquades berfungsi untuk mempermudah pakan dalam menyerap senyawa boraks. Langkah selanjutnya yaitu dengan melakukan pengujian menggunakan kit BMR terhadap pakan untuk mengkonfirmasi kandungan boraks dalam pakan agar kandungan boraks sesuai dengan yang diinginkan.

Pemaparan pada tikus dilakukan dengan cara memberikan pakan dengan kadar boraks yang mengandung 10.300 ppm boraks sebanyak 5 gram/100gBB, hal ini didasarkan pada rata-rata pakan tikus yang dapat dikonsumsi per hari. Pemberian sediaan pakan mengandung borak diberikan pada kelompok tikus B, C, D, dan E selama 21 hari. Pada hari ke-22 dilakukan pembedahan pada hewan coba untuk pengamatan aktivitas protease dan gambaran histopatologi jejunum.

#### 4.6.4 Pembuatan Kefir Sari Kedelai dan Cara Pemberian

Metode yang digunakan untuk membuat sari kedelai yaitu menggunakan metode ekstraksi air terhadap biji kedelai, dengan tahapan awal yang berupa pencucian serta perendaman biji kacang kedelai dengan menggunakan air selama satu malam. Perendaman biji kedelai dilakukan agar mudah hancur ketika diblender. Setelah dilakukan perendaman, kulit kacang kedelai dikupas dan dihancurkan dengan blender hingga halus. Perbandingan pembuatan sari kedelai yaitu air dengan kacang kedelai adalah 8 L air : 1 kg kacang kedelai. Setelah kedelai halus, kemudian akan disaring dengan menggunakan kain saring untuk mendapatkan filtrat atau sari kedelai yang murni. Selanjutnya ditambahkan 4% gula ke dalam sari kedelai lalu didinginkan sambil diaduk perlahan. Tahap selanjutnya sari kedelai yang sudah jadi akan didinginkan hingga suhu kamar ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ).

Pembuatan kefir sari kedelai 5% dilakukan dengan memasukkan 100 gram grain kefir ke dalam dua liter sari kedelai kemudian diaduk perlahan hingga tercampur rata. Setelah itu diinkubasi selama 20-24 jam pada suhu kamar (suhu  $25-37^{\circ}\text{C}$ ) agar proses fermentasi dapat berlangsung. Apabila sari mengalami penggumpalan atau tampak terpisah menjadi 2 atau 3 lapisan, yaitu dadih sari (*curd*), serum (*whey*), dan terkadang terdapat lapisan lemak serta tercium aroma tapai yang mengindikasikan adanya aktivitas fermentasi maka dapat disaring dengan menggunakan saringan plastik untuk mendapatkan granula kefir kembali. Kefir yang sudah disaring siap untuk dikonsumsi atau diberikan kepada tikus sebagai perlakuan atau dapat disimpan dalam lemari pendingin untuk

memperpanjang masa simpan dengan suhu sekitar 4<sup>0</sup> C (modifikasi BBpascapertanian, 2007 ; Fratiwi, dkk., 2008).

Kemudian dilakukan pengujian secara mikrobiologis terhadap kefir sari kedelai yang telah siap untuk dikonsumsi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk mengetahui kandungan bakteri asam laktat dan total *yeast* yang terdapat pada kefir sari kedelai. Selain itu juga dilakukan pengujian LC-MS untuk memastikan bahwa didalam kefir sari kedelai mengandung antioksidan yang berupa genistein.

Pemberian kefir 5% pada kelompok C, D, dan E selama 21 hari dilakukan melalui sonde lambung. Selama 21 hari, kelompok tikus pertama hanya diberikan air minum dan pakan standart (A), kelompok kedua diberikan pakan yang mengandung boraks dan tanpa pemberian kefir sari kedelai (B), kelompok ketiga, keempat, dan kelima diberikan pakan yang telah dicampur dengan boraks dan diberikan kefir sebanyak 0,5 ml/100gBB/hari (C), 1 ml/100gBB/hari (D) dan 1,5 ml/100gBB/hari (E). Pada hari ke-22 tikus dibedah dan diamati aktivitas protease serta gambaran histopatologi jaringan jejunum.

#### **4.6.5 Uji Konfirmasi Kandungan Boraks Pakan**

Tujuan dari uji konfirmasi kandungan boraks dalam pakan yang akan diberikan kepada kelompok tikus yaitu untuk memastikan bahwa pakan yang akan diberikan sebagai perlakuan benar-benar mengandung boraks dengan konsentrasi 10.300 ppm boraks. Uji konfirmasi ini dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 1 gram pakan yang akan diuji kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan larutan BMR (*Boraks Main Reagent*) sebanyak 2-

3 ml lalu dilakukan pengocokan selama 2-3 menit. Kemudian ditunggu selama 3-5 menit sampai timbul perubahan warna, kemudian warna yang timbul dibandingkan dengan warna standart sehingga diketahui kandungan boraksnya (Mahdi, 2013).

#### **4.6.6 Pengambilan Organ Jejunum**

Pengambilan organ jejunum pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan setelah seluruh perlakuan dilakukan selama 21 hari. Langkah pertama yang dilakukan adalah dislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian diletakkan pada papan bedah dan tikus diposisikan rebah dorsal. Scalpel, gunting, dan pinset merupakan alat yang digunakan saat proses pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian abdomen, kemudian diambil bagian jejunum yang terletak pada bagian akhir dari duodenum dengan panjang sekitar 900 mm hingga 1350 mm yang mengisi bagian sebelah kanan perut. Jejunum kemudian diisolasi dan dipotong. Organ jejunum dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin. Kemudian organ jejunum dibagi menjadi dua bagian dan dimasukkan dalam larutan *Phospate Buffer Saline-azida* (PBS – azida) pH 7,4 dan larutan paraformaldehid 4% (PFA) untuk pengujian aktivitas protease dan histopatologi.

#### **4.6.7 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease**

##### **4.6.7.1 Isolasi Protein**

Organ jejunum ditimbang 0,3 gram, kemudian dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting bedah, ditambah sedikit pasir kuarsa, dan digerus dengan

mortar dingin yang diletakkan diatas balok es. Setelah itu homogenat ditambah dengan larutan PBS – Tween : PSMF (9 : 1) sebanyak 1 mL dan dipindahkan ke dalam tabung *effendrof* steril. Dilanjutkan dengan menyvorteks selama 15 menit (6000 rpm), dan selama 10 menit disonikasi dengan sonikator. Kemudian supernatannya diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1 : 1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm), diambil endapannya dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan larutan 0,02 M Tris – HCl pH 6,5 dingin perbandingan volume 1 : 1 (Walter, 1984).

#### **4.6.7.2 Pembuatan Kurva Baku Tirosin**

Langkah awal dalam pembuatan kurva baku tirosin yaitu disiapkan 10 labu ukur dan masing-masing diisi larutan baku tirosin 20 ppm 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 mL untuk konsentrasi 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm. Selanjutnya ditambah akuades sampai tanda batas kemudian tabung ditutup dengan alumunium foil lalu dikocok. Selanjutnya diukur absorbansinya pada masing-masing konsentrasi larutan baku pada panjang gelombang maksimum yaitu 275 λ. Blanko yang digunakan adalah akuades.

#### **4.6.7.3 Pengukuran Aktivitas Protease Isolasi Protein Jejenum**

Diawali dengan mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 μL, 300 μL larutan buffer fosfat pH 7 dan 100 μL enzim protease lalu didiamkan 60 menit pada suhu 37<sup>0</sup>C di atas inkubator. Kemudian ditambahkan 400 μL larutan TCA 4% didiamkan selama 30 menit pada suhu 27<sup>0</sup>C (suhu kamar). Selanjutnya diputar

dengan alat sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil 300  $\mu\text{L}$  dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada  $\lambda$  maks tirosin. Blanko yang digunakan dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas, tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim.

Adapun pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan metode walter (1984) menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times f_p$$

Dimana : v = volume total sampel (mL)  
 q = waktu inkubasi (mL)  
 $f_p$  = faktor pengenceran  
 p = jumlah enzim (mL)

#### 4.6.8 Cara Pembuatan Preparat Histopatologi

##### 4.6.8.1 Fiksasi

Fiksasi dilakukan dengan cara yang pertama organ jejunum dibilas dengan NaCl – fisiologis 0,9% dingin. Kemudian organ jejunum dibagi dan dimasukkan dalam larutan *paraformaldehid* 4% (PFA). Fiksasi memiliki tujuan yaitu untuk mencegah adanya kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, dan mengawetkan komponen histologis.

##### 4.6.8.2 Dehidrasi dan Infiltrasi

Proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90%, 95%. Proses dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan air dari dalam



jaringan. Lama jaringan dalam larutan etanol berkisar antara 10 menit hingga 30 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4<sup>0</sup>C.

#### **4.6.8.3 Penjernihan (*Clearing*)**

Penjernihan bertujuan untuk menggantikan tempat etanol dalam jaringan. Reagen yang dipergunakan adalah xylol. Jaringan dipindahkan dari alkohol absolut III ke larutan penjernihan (xylol). Penjernih dilakukan dalam xylol I (1 jam), xylol II (1 jam), dan xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator).

#### **4.6.8.4 Infiltrasi Parafin**

Infiltrasi parafin dilakukan dengan cara memasukkan jaringan dalam parafin cair I, parafin cair II, dan parafin cair III (masing-masing 1 jam di dalam oven). Infiltrasi parafin ini bertujuan untuk menggantikan kedudukan dehidran dalam jaringan dan bahan penjernih dengan parafin cair.

#### **4.6.8.5 Penanaman Jaringan (*Embedding*)**

*Embedding* dilakukan dengan cetakan yang di dalamnya diisi parafin cair. Blok parafin yang sudah membeku tersebut dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisi sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 4 µm. pada awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama semalam lalu siap untuk diwarnai dengan pewarnaan HE.

#### **4.6.8.6 Pewarnaan *Hematoksilin-Eosin***

Pewarnaan *Hematoksilin – Eosin* dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksilin untuk memberi warna biru pada inti sel (basofilik) serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksilin, digunakan untuk mewarnai



sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda. Proses yang dilakukan yaitu deparafinasi dengan menggunakan xylol dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II, dan III masing-masing 5 menit, ethanol 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna hematoksilin selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah itu sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama beberapa detik, dan dilanjutkan dengan alkohol 100% I,II dan III masing-masing selama 2 menit. Selanjutnya dilakukan proses *Clearing* dengan xylol I, II dan III selama 3 menit dan ditutup dengan *cover glass*.

Preparat organ jejunum diamati menggunakan mikroskop cahaya *olympus BX51*. Bagian yang diamati yaitu adanya perubahan pada mukosa meliputi pada diskumasi epitel, pendarahan, kerusakan vili, dan adanya infiltrasi sel radang pada jejunum.

#### **4.7 Analisa Data**

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini yaitu perubahan kadar aktivitas protease yang dianalisis menggunakan Analisis Ragam *one way analysis of varians ANOVA* dan uji lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur)  $\alpha = 0,05$  untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan, sedangkan analisa data histopatologi dilakukan secara kualitatif dengan pengamatan secara deskriptif (Kusriningrum, 2008).

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Pengaruh Preventif Kefir Sari Kedelai Terhadap Aktivitas Protease Pada Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Dipapar Boraks Melalui Pakan

Hasil uji aktivitas protease dari organ jejunum tikus *Rattus norvegicus* dilakukan untuk mengetahui tingkat keparahan suatu inflamasi akibat pemberian boraks melalui pakan dengan dosis 10.300 ppm boraks dan setelah pemberian kefir sari kedelai. Aktivitas protease pada saat inflamasi akan meningkat dari kondisi normal. Hasil pengukuran aktivitas protease jejunum tikus *Rattus norvegicus*, didapatkan data seperti yang terdapat pada Tabel 5.1. Unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai banyaknya mikro mol ( $\mu\text{mol}$ ) tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada kasein oleh protease hasil isolasi dari organ jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada kondisi optimum yaitu pH 6,5, suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , dan waktu inkubasi 60 menit (Ranuh, 2008).

Tabel 5.1 : Aktivitas protease jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi kefir sari kedelai dan dipapar pakan boraks

Kelompok	Rataan Aktivitas protease ( $\mu\text{mol}/\text{ml}.\text{menit}$ ) $\pm\text{SD}$	Aktivitas protease (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kontrol negatif	$0,1312 \pm 0,0037^a$	0	0
Induksi boraks melalui pakan	$0,2808 \pm 0,0057^e$	114,02	-
Terapi kefir 0,5 ml/100gBB	$0,2612 \pm 0,0029^d$	-	6,98
Terapi kefir 1 ml/100gBB	$0,2014 \pm 0,0060^c$	-	28,27
Terapi kefir 1,5 ml/100gBB	$0,1565 \pm 0,0049^b$	-	44,26

Keterangan : Notasi a,b,c,d,e menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dengan nilai  $p < 0,05$

Kelompok kontrol negatif menunjukkan nilai dari aktivitas protease sebesar  $0,1312 \pm 0,0037$   $\mu\text{mol/ml.menit}$ . Nilai aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif digunakan sebagai standar dalam menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi akibat pengaruh perlakuan. Enzim protease bekerja sebagai biokatalis dalam reaksi pemecahan molekul protein dengan cara hidrolisis, sehingga enzim protease selalu ada dalam tubuh. Enzim protease secara normal terdapat dalam jaringan tubuh yang berperan dalam pertahanan tubuh yaitu pemecahan protein asing yang masuk dalam tubuh. Protease berperan dalam perkembangan sel yaitu pada perakitan kolagen dari prokolagen, proliferasi sel yaitu kontrol proteolitik terhadap kematian sel yang terprogram (apoptosis) (Chapman, 1997).

Kelompok tikus yang dipapar boraks sebesar 10.300 ppm melalui pakan mengalami peningkatan dengan nilai aktivitas protease yaitu  $0,2808 \pm 0,0057$   $\mu\text{mol/ml.menit}$  dari kelompok kontrol negatif dengan nilai kenaikan aktivitas protease sebesar 114,02%. Hasil uji statistika menggunakan SPSS 2.1 *for windows* nilai *p-value* ( $p < 0,05$ ) yang dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) menunjukkan adanya pengaruh perbedaan yang nyata antar perlakuan. Kelompok kontrol positif yang dipapar boraks melalui pakan dengan notasi e memiliki perbedaan yang nyata dengan tikus kontrol negatif yang memiliki notasi a. Perhitungan uji statistika secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 10**.

Meningkatnya aktivitas protease mengindikasikan terjadinya peradangan atau inflamasi pada jejunum tikus hasil paparan boraks melalui pakan. Penelitian

Krieger (2001) menyatakan bahwa pemberian boraks dengan konsentrasi 10.300 ppm boraks dalam pakan dapat menyebabkan dampak sistemik seperti degenerasi testis, atrofi testis, dan sterilisasi pada tikus. Kerusakan sistemik pada salah satu organ tubuh juga mengindikasikan adanya kerusakan pada jaringan tubuh lain. Boraks merupakan senyawa kimia turunan dari logam berat boron yang apabila dikonsumsi secara terus menerus akan menimbulkan terbentuknya radikal bebas serta efek akumulasi negatif pada tubuh yang bersifat karsinogenik (Oktavia, 2012). Produksi radikal bebas yang tidak terkendali dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif sehingga menimbulkan kerusakan sel seperti inflamasi. Kerusakan sel seperti inflamasi akan meningkatkan aktivitas neutrofil serta pelepasan enzim protease yang menyebabkan kerusakan jaringan (Campbell *et al.*, 2006; Houser *et al.*, 2012).

Paparan boraks dengan dosis 10.300 ppm melalui pakan dapat mengaktifkan makrofag yang berperan dalam respon imun mukosa jejunum yang dikenali sebagai antigen luminal. Boraks akan memicu peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) berupa radikal hidroksil ( $\text{OH}^*$ ), hydrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dan radikal lipida ( $\text{R}^*$ ). Senyawa reaktif ini memiliki elektron bebas yang tidak berpasangan dan bersifat reaktif dalam tubuh. Radikal bebas di dalam tubuh secara normal akan diseimbangkan oleh antioksidan endogen tubuh yaitu *Superoksidase Dismutase* (SOD), banyaknya jumlah radikal bebas di dalam tubuh menyebabkan ketidakseimbangan antara antioksidan endogen dengan jumlah radikal bebas sehingga terjadi stress oksidatif. Terjadinya stress oksidatif menyebabkan elektron yang bebas berusaha untuk menyeimbangkan dengan cara

menyerang atom hidrogen pada makromolekul dalam jaringan seperti protein, lemak dan karbohidrat. Hilangnya atom hidrogen pada makromolekul sel dapat menyebabkan ketidakseimbangan sel sehingga zat-zat di sekitar sel bisa keluar masuk sehingga membuat jaringan rusak. Adanya kerusakan jaringan akan menyebabkan aktivasi neutrofil dan pelepasan enzim protease.

Produksi ROS yang berlebih juga dapat mengaktifkan NF- $\kappa$ B yang merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi sel-sel sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL4, IL2, dan IL3. Adanya TNF- $\alpha$  yang berlebih pada sel akan menyebabkan inflamasi dan meningkatkan aktivasi neutrofil. IL4 dan IL3 akan mengaktifkan sel B, sehingga akan memproduksi IgE untuk mengaktifkan sel mast. Sel mast dan neutrofil yang teraktivasi akan menghasilkan protease sebagai respon terhadap adanya inflamasi (Zhang *et al.*, 2001, Campbell *et al.*, 2006). Oleh karena itu pengukuran aktivitas protease bisa digunakan untuk mengukur tingkat keparahan inflamasi, semakin tinggi nilai aktivitas protease maka semakin parah keadaan inflamasinya.

Enzim protease berperan dalam perbaikan sel yang mengalami kerusakan akibat adanya inflamasi. Akan tetapi peningkatan jumlah protease pada jaringan yang mengalami inflamasi dapat menyebabkan aktivitas protease berlebih dan tidak terkontrol, sehingga menyebabkan kerusakan sel. Jenis protease yang terlibat dalam kerusakan jaringan adalah protease serin (elastase neutrofil) (Bratawidjaya, 2010). Neutrofil adalah suatu sel yang berperan pada proses inflamasi. Neutrofil berfungsi sebagai penghancur mikroorganisme tetapi juga dapat merusak sel maupun jaringan (Weiss, 1989).

Berdasarkan analisa *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LCMS) (**Lampiran 3**) terbukti bahwa kefir sari kedelai mengandung senyawa daidzein dan genistein yang berfungsi sebagai antioksidan. Genistein dan daidzein merupakan antioksidan eksogen yang dapat menyeimbangkan dan mencegah peningkatan aktivitas protease dalam tubuh. Selain itu, pembuatan kefir sari kedelai 5% diperoleh jumlah Bakteri Asam Laktat sebesar  $2,9 \times 10^5$  CFU/ml, sedangkan jumlah yeast yang terkandung dalam kefir sari kedelai 5% sebesar  $1,6 \times 10^7$  CFU/ml. Menurut Farnworth (2005) Bakteri Asam Laktat dan *Yeast* pada susu hasil fermentasi kefir masing masing berkisar antara  $10^8$ - $10^9$  dan  $10^5$ - $10^6$ .

Pemberian preventif dosis 0,5 ml/100gBB, dosis 1 ml/100gBB dan kelompok dosis 1,5 ml/100gBB mampu menurunkan kadar protease yang menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan notasi d pada dosis 0,5 ml/100gBB, notasi c pada dosis 1 ml/100gBB dan notasi b pada dosis 1,5 ml/100gBB (**Lampiran 10**). Hasil pemberian kefir sari kedelai 5% kelompok dosis 0,5 ml/100gBB kadar aktivitas protease menurun sebesar 6,98% ( $0,2612 \pm 0,0029$   $\mu\text{mol/ml.menit}$ ), kefir sari kedelai dosis 1 ml/100gBB sebesar 28,27% ( $0,2014 \pm 0,0060$   $\mu\text{mol/ml.menit}$ ) dan pada dosis 1,5 ml/100gBB sebesar 44,26% ( $0,1565 \pm 0,0049$   $\mu\text{mol/ml.menit}$ ) dari tikus yang dipapar boraks melalui pakan tanpa pemberian kefir sari kedelai (Tabel 5.1). Penurunan kadar protease pada kelompok preventif menunjukkan adanya perbaikan inflamasi setelah pemberian suplementasi kefir sari kedelai 5%. Penurunan kadar aktivitas protease dikarenakan dalam kefir sari kedelai mengandung isoflavon yang bertindak sebagai antioksidan dan anti-inflamasi yang mampu memperbaiki inflamasi.



Antioksidan berupa isoflavan pada kefir sari kedelai 5% berfungsi sebagai *Scavenger* radikal bebas yang berlebih pada jejunum akibat paparan boraks melalui pakan dengan mendonasikan atom hidrogen (H) pada radikal bebas.

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidan serta mampu menetralkan radikal bebas (Widjaya, 2003). Antioksidan dibagi menjadi dua yaitu antioksidan non enzimatis yang didapatkan dari luar tubuh seperti isoflavan dan antioksidan enzimatis yang didapat didalam tubuh. Produksi ROS dalam tubuh yang normal dapat diseimbangkan oleh antioksidan endogen yaitu enzim *Superoksida Dismutase* (SOD). Pada kondisi inflamasi hasil pemberian boraks melalui pakan dapat mengaktifkan makrofag yang akan menyebabkan pelepasan sitokin inflamasi dan *Reactive Oxygen Species* (ROS), meningkatnya radikal bebas didalam jejunum mengakibatkan antioksidan enzimatis endogen tidak dapat menyeimbangkan radikal bebas yang jumlahnya berlebih sehingga radikal bebas tersebut dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Maka dari itu diperlukan antioksidan non enzimatis yang berasal dari luar tubuh yaitu salah satunya kandungan isoflavan dalam kefir sari kedelai.

Mekanisme kerja dari isoflavan sebagai antioksidan yaitu dengan cara mendonasikan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas ( $R^*$ ) sehingga isoflavan berubah menjadi radikal fenoksil isoflavan. Radikal fenoksil isoflavan yang terbentuk akan diserang kembali oleh radikal bebas ( $R^*$ ) sehingga membentuk radikal fenoksis isoflavan yang kedua, karena radikal fenoksis isoflavan mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi maka dapat



menyeimbangkan dengan cara delokalisasi elektron sehingga menjadi senyawa kuinon yang stabil.

Efek radikal bebas yang diredam oleh senyawa isoflavon, maka ROS dalam jejunum berkurang atau hilang. Hilangnya radikal bebas dapat menekan pembentukan NF- $\kappa$ B yang merupakan faktor transkripsi sejumlah gen penting dalam proses imunitas dan inflamasi, salah satunya untuk membentuk TNF- $\alpha$  (Chattopadhyay *et al.*, 2006). Tidak teraktivasinya TNF- $\alpha$  maka aktivasi neutrofil yang berfungsi sebagai imunitas pertama akan menurun. Penurunan neutrofil akan menekan neutrofil untuk pelepasan protease, sehingga aktivitas protease pada jejunum dapat menurun.

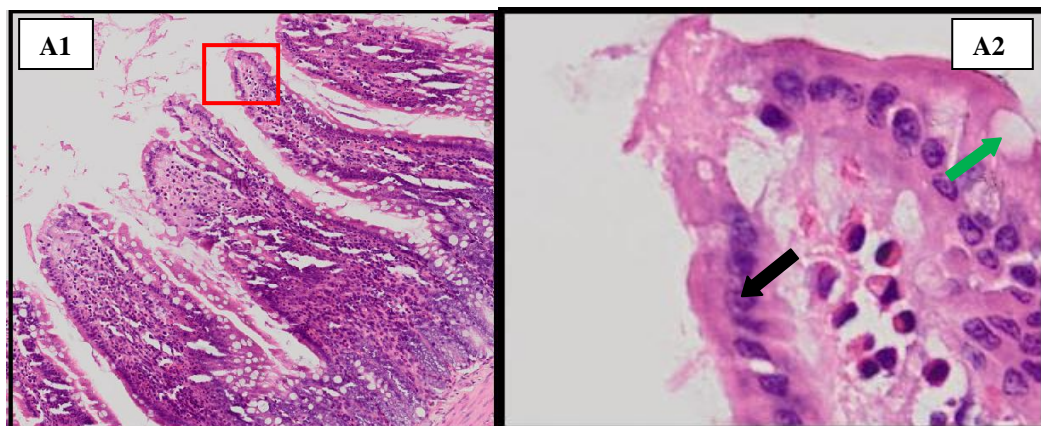
## **5.2. Pengaruh Preventif Kefir Sari Kedelai Terhadap Kerusakan Gambaran Histopatologi Pada Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Dipapar Boraks Melalui Pakan**

Dalam penelitian ini selain menggunakan parameter aktivitas protease juga menggunakan parameter histopatologi dengan pewarnaan *Hematoksilin Eosin* (HE) yang berfungsi sebagai salah satu penentu keberhasilan suatu preventif. Histologi jejunum tikus secara normal yaitu memiliki vili yang lebih tipis, lebih kecil dan jumlahnya lebih sedikit daripada duodenum. Epitel berbentuk silindris selapis dengan disisipi oleh beberapa sel goblet. Lamina propia tersusun atas jaringan ikat longgar. Pada tunika mukosa juga terdapat sel goblet yang berfungsi dalam menghasilkan mukus yang berperan dalam mempermudah penyerapan makanan. Adanya sel goblet memberi perlindungan permukaan usus halus dari ancaman zat toksik yang masuk ke dalam tubuh dan mukus yang dilepaskan oleh sel goblet akan mengurangi perlekatan zat toksik pada mukosa usus dan dengan

bantuan peristaltik usus akan dikeluarkan bersama dengan feses (Balqis dkk., 2007).

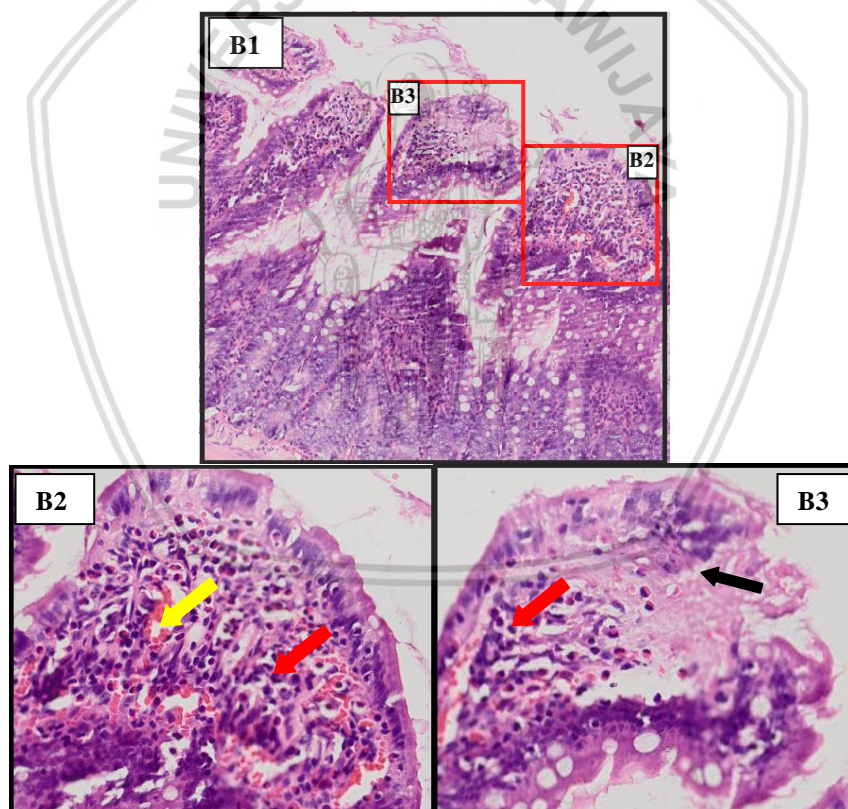
Jejunum terdiri dari tunika serosa, muskularis eksterna dan interna, submukosa, dan mukosa. Tunika submukosa merupakan lapisan jaringan ikat tidak beraturan padat yang mengandung pembuluh darah dan saluran limfa. Tunika serosa merupakan lapisan terluar dari usus halus yang terdiri atas pembuluh darah dan limfe serta terbentuk dari sel-sel epitel silindris selapis. Tunika muskularis tersusun dari sel-sel otot polos dan terdapat *plexus myentericus Auerbach* yang berperan dalam aktivitas peristaltik usus halus. Tunika mukosa terdiri atas suatu membran epitel permukaan yang basah dilapisi mukus yang terletak di atas suatu lamina basal. Bagian bawah terdapat sedikit jaringan ikat longgar dan lapisan tipis otot polos (Kiernan, 2000).

Hasil dari pengamatan histopatologi jejunum dengan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) menggunakan perbesaran 400x dapat dilihat pada Gambar 5.1 dengan mengamati adanya perubahan struktur vili, sel goblet dan pendarahan atau hemoragik. Pada kelompok kontrol (Gambar 5.1) menunjukkan gambaran histopatologi jejunum tikus tanpa pemberian kefir sari kedelai dan induksi boraks melalui pakan. Pada kelompok ini dapat diamatai bahwa pada lapisan mukosa tersusun rapi dan teratur.



**Gambar 5.1** : Histologi vili organ jejunum tikus kontrol negatif/normal

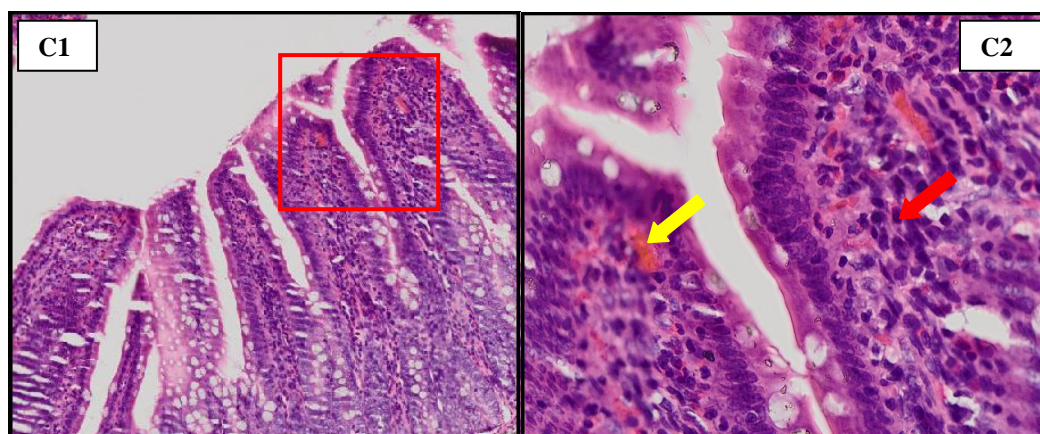
**Keterangan:**(A1) vili jejunum tikus kontrol/normal perbesaran 100x; (A2) vili jejunum tikus perbesaran 400x, terdiri atas vili yang tersusun dari sel epitel silindris selapis ( ↑ ) dan sel goblet ( ↑ )





**Gambar 5.2** : Histopatologi vili organ jejunum tikus kontrol positif/ pakan boraks

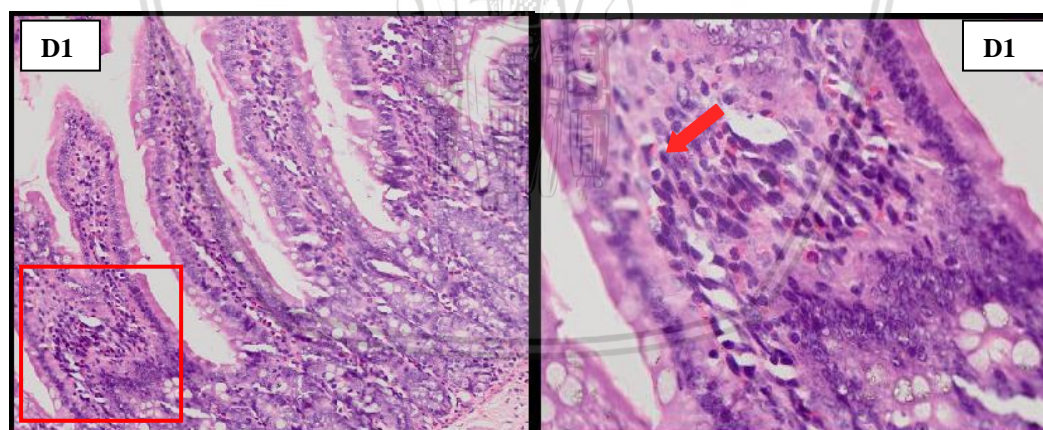
**Keterangan:**(B1) vili jejunum tikus control positif perbesaran 100x dengan struktur sel epitel pada vili mengalami radang dan terlihat mengalami hemoragik; (B2) vili jejunum tikus perbesaran 400x, terlihat sel mengalami inflamasi ditandai dengan adanya hemoragik ( ↑ ) dan infiltrasi sel radang ( ↑ ); (B3) vili jejunum tikus perbesaran 400x yang tampak mengalami deskuamasi epitel ( ↑ )






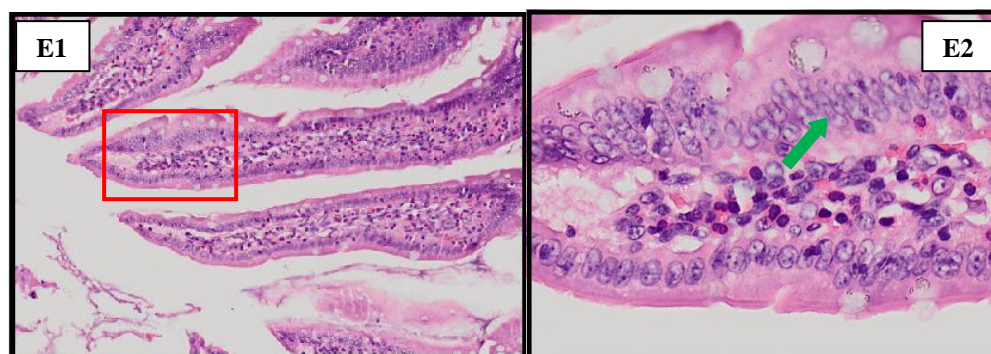
**Gambar 5.3** : Histopatologi vili organ jejunum tikus terapi kefir sari kedelai dosis 0,5 ml/100gBB

**Keterangan:**(C1) vili jejunum tikus perbesaran 100x masih tampak terlihat adanya hemoragik dan infiltrasi sel radang; (C2) vili jejunum tikus perbesaran 400x, masih terdapat adanya hemoragik (  ) dan infiltrasi sel radang (  )



**Gambar 5.4** : Histopatologi vili organ jejunum tikus terapi kefir sari kedelai dosis 1 ml/100gBB

**Keterangan:**(D1) vili jejunum tikus perbesaran 100x yang sudah mulai menunjukkan perbaikan ditandai dengan tidak adanya hemoragik namun masih terdapat infiltrasi sel radang; (D2) vili jejunum tikus perbesaran 400x, masih terdapat adanya infiltrasi sel radang (  )



**Gambar 5.5** : Histopatologi vili organ jejunum tikus terapi kefir sari kedelai dosis 1,5 ml/100gBB

**Keterangan:**(E1) vili jejunum tikus perbesaran 100x; (E2) vili jejunum tikus perbesaran 400x, terlihat sel-sel epitel pada vili yang mengalami regenerasi ( ↑ ).

Histologi ini dapat dijadikan patokan adanya perubahan dan kerusakan yang terjadi pada kelompok lainnya. Pada kelompok kontrol terlihat tunika mukosa jejunum yang terdiri atas vili intestinalis, lamina propia, serta sel epitel silindris selapis yang disertai dengan sel goblet. Hasil histopatologi (Gambar 5.2) pada kelompok yang dipapar boraks melalui pakan terdapat kerusakan pada daerah mukosa jejunum. Kondisi adanya kerusakan pada jejunum ditandai dengan kerusakan pada lapisan mukosa berupa kerusakan vili, deskuamasi epitel, pelebaran lamina propia, banyaknya infiltrasi sel radang dan perbesaran bahkan hilangnya sel goblet. Adanya kerusakan jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) ini sesuai dengan aktivitas protease yang mengalami peningkatan.

Kondisi adanya toksisitas boraks yang diberikan pada tikus lewat pakan menyebabkan perubahan histologi pada jejunum karena pemberian boraks yang masuk ke dalam saluran pencernaan. Menurut Elbakary (2014) jaringan jejunum yang terpapar zat toksik akan terlihat adanya peningkatan tinggi vili usus, infiltrasi sel radang, peningkatan maupun hilangnya jumlah sel goblet, dan

*distortion* lapisan sel epitel. Histopatologi yang terjadi berupa adanya hemoragik pada daerah mukosa jejunum, hilangnya sebagian sel goblet dan terjadi erosi sel pada mukosa usus. Kondisi hemoragik dapat disebabkan oleh sel epitelium permukaan jejunum langsung bersentuhan dengan substansi toksin yang terabsorpsi. Di dalam lamina propia terdapat adanya limfosit serta sel-sel radang. Hemoragik ini juga terjadi karena adanya eritrosit pada dinding kapiler yang masuk ke dalam jaringan, kemudian eritrosit keluar dari pembuluh darah yang terdorong oleh tekanan darah melalui dinding kapiler yang cedera, maka eritrosit yang keluar dari pembuluh darah tampak seperti adanya infiltrasi eritrosit di dalam jaringan (Gunstream and Harold, 2001). Erosi epitel atau deskuamasi epitel menggambarkan hilangnya epitel usus tanpa disertai hilangnya muskularis mukosa. Deskuamasi epitel terjadi karena adanya perlepasan epitel yang menempel pada membran basalis sehingga jarak antara vili terlihat lebar. Deskuamasi epitel yang terjadi menyebabkan sel goblet rusak dan menghilang. Sel goblet memiliki fungsi yaitu menghasilkan mucus sebagai proteksi terhadap adanya patogen dari luar seperti zat toksik boraks. Epitel yang mengalami kerusakan disebabkan oleh berkurangnya sekresi mucus sel goblet yang berfungsi untuk melindungi mukosa jejunum. Jejunum adalah salah satu bagian dari usus halus yang berfungsi sebagai absorpsi nutrisi makanan melalui proses enzimatik pencernaan. Jejunum memiliki bentukan berupa vili yang berfungsi untuk meningkatkan luas permukaan usus serta membantu dalam penyerapan nutrisi tubuh. Kerusakan vili usus yang terjadi dapat menyebabkan zat tidak terserap di dalam usus halus. Hal ini dapat terjadi sebagai akibat adanya zat toksik sebagai



salah satu xenobiotik yang dapat mengganggu proses penyerapan makanan (Natalia, 2007).

Paparan boraks melalui pakan akan menimbulkan efek toksisitas pada tubuh sehingga akan menghasilkan senyawa radikal bebas dimana radikal bebas dapat menghasilkan suatu senyawa oksigen reaktif (ROS) yaitu senyawa yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga tidak stabil dan mudah reaktif. Mekanisme perusakan jaringan jejunum yang terpapar boraks terjadi karena ROS mampu merusak lipid dan protein yang merupakan komponen utama penyusun jaringan. Salah satu senyawa ROS yang berbahaya adalah radikal hidroksil ( $\text{OH}^*$ ) dimana akan memberikan dampak negatif terhadap membran sel. Radikal hidroksil dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Kerusakan sel pada bagian jejunum akibat peroksidasi lipid akan menyebabkan lapisan mukosa usus tidak dapat menyerap nutrisi makanan sehingga metabolisme dalam tubuh terganggu (Hariono, 2006).

Pemberian boraks yang masuk kedalam organ jejunum akan mengaktifkan sel T helper 2 ( $\text{Th}_2$ ) yang akan menghasilkan sitokin pro-inflamasi berupa  $\text{TNF-}\alpha$  yang akan menyebabkan inflamasi. Adanya inflamasi maka terjadi peningkatan vasodilatasi pembuluh darah yang akan menyebabkan sitokin-sitokin pro-inflamasi masuk kedalam jaringan jejunum. Semakin banyak sitokin yang terdapat di daerah inflamasi maka mengakibatkan banyaknya jumlah radikal bebas yang mampu merusak jaringan jejunum. Pada (Gambar 5.2) kelompok tikus pemberian boraks terdapat adanya infiltrasi sel radang. Menurut Khumar *et al* (2006) pada proses inflamasi  $\text{TNF-}\alpha$  yang diproduksi secara berlebih akan menyebabkan



aktivasi neutrofil. Neutrofil memiliki fungsi sebagai fagositosis partikel partikel kecil. Neutrofil akan melepaskan enzim protease yang berperan dalam penyembuhan luka. Protease yang terdapat pada neutrofil adalah protease serin neutrofil yang berfungsi menghancurkan mikroorganisme dalam sel radang tetapi juga dapat merusak sel maupun jaringan inang. Mekanisme enzim protease dalam merusak jaringan terjadi 2 jalur yaitu melalui jalur respon langsung dan sel dendrite. Jalur pertama melalui respon langsung protease yang berikatan reseptor *Protease Activated Reseptor* (PAR) dan jalur yang kedua melalui sel dendrite yang dapat mengaktifkan sel Helper 2 serta aktivasi sel B untuk membentuk IgE sehingga sel mast akan teraktifasi. Sel mast yang aktif mampu mengeluarkan enzim proteolitik yang dapat merusak jaringan mukosa pada jejunum (Caughey, 2011). Histopatologi jejunum pada kelompok kontrol pemberian boraks melalui pakan sebanding dengan peningkatan aktivitas protease yang terjadi terhadap kontrol negatif. Kondisi ini terjadi akibat semakin meningkat nilai aktivitas protease pada kelompok kontrol positif maka berbanding lurus dengan terjadinya kerusakan epitel dan lapisan mukosa pada jejunum akibat pemberian boraks melalui pakan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian boraks melalui pakan dapat meningkatkan aktivitas protease dan menyebabkan kerusakan jejunum.

Kelompok perlakuan yang diberikan kefir sari kedelai 5% dosis 0,5 ml/100gBB pada pengamatan perbesaran 400X sudah terlihat adanya perbaikan yang ditandai banyaknya sel goblet, susunan epitel yang teratur akan tetapi masih terdapat infiltrasi sel radang dan hemoragik pada lamina propria (Gambar 5.3). Pada kelompok perlakuan yang diberi kefir sari kedelai 5% dosis 1 ml/100gBB

masih terlihat adanya infiltrasi sel radang yang terbentuk (Gambar 5.4). Kelompok perlakuan yang diberi kefir sari kedelai 5% dosis 1,5 ml/100gBB terlihat mengalami perbaikan yang lebih baik dibandingkan kelompok sebelumnya. Hal ini ditunjukkan dengan adanya perbaikan dari kerusakan vili usus berupa berkurangnya gambaran hemoragik dan erosi sel pada mukosa usus serta sel epitel yang mengalami regenerasi (Gambar 5.5). Hal ini dapat disebabkan karena adanya pengaruh dari antioksidan yang terkandung dalam kefir sari kedelai. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada dosis preventif 1,5 ml/100gBB mampu mempertahankan gambaran histopatologi jejunum tikus putih yang ditunjukkan dengan keadaan struktur vili yang lebih baik dibandingkan dengan dosis preventif 0,5 ml/100gBB dan 1 ml/100gBB.

Penurunan kerusakan pada jaringan jejunum dikarenakan pada kefir sari kedelai terdapat senyawa aktif isoflavon yang mampu mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R) menjadi stabil. Senyawa isoflavon dapat menghambat sel T helper 2 (Th2) sehingga TNF- $\alpha$  tidak teraktivasi. TNF- $\alpha$  yang tidak teraktivasi maka neutrofil akan menurun. Neutrofil yang tidak teraktivasi akan menurunkan kadar protease dan menurunkan kadar radikal bebas sehingga kerusakan sel dapat berkurang dan terjadi perbaikan jaringan jejunum melalui proses regenerasi sel (Zhang *et al.*, 2005, Chambell *et al.*, 2006). Proses regenerasi sel terjadi dengan cara sel-sel induk bermitosis untuk mempertahankan populasinya dan untuk membentuk sel-sel epitel silindris baru.

Perbaikan struktur vili terjadi karena Bakteri Asam Laktat dan *yeast* yang terdapat pada kefir sari kedelai mampu menstimulasi system imunitas melalui

ikatan terhadap sel intestinal dan interaksi dengan GALT (Gut associated-lymphoid tissue) yang merupakan organ limfoid yang terdapat dalam saluran pencernaan. Probiotik ini akan memicu produksi sitokin anti inflamasi dan mengurangi produksi sitokin proinflamasi sehingga memperkuat barier mukosa jejunum (Markwick, 2004). Selain itu, Bakteri Asam Laktat pada kefir sari kedelai juga dapat membantu proses pencernaan pada usus dengan cara memecah protein menjadi asam amino, dimana asam amino yang diserap oleh usus akan membantu memperbaiki lapisan mukosa yang rusak (Muchtadi, 1997; Siregar, 2004).

Dari hasil tersebut dapat dibuktikan bahwa kefir sari kedelai mampu mempertahankan struktur jaringan pada vili jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar boraks melalui pakan karena mengandung Bakteri Asam Laktat (BAL), *yeast* dan antioksidan isoflavan yang dapat dijadikan sebagai antiinflamasi dan gastroprotektif. Kandungan antioksidan isoflavan, Bakteri Asam Laktat (BAL) dan *yeast* tersebut mampu mempertahankan serta memperbaiki kerusakan mukosa jejunum dari kasus terpapar zat toksik boraks dengan cara menurunkan kadar enzim protease dan neutrofil.

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan suatu kesimpulan bahwa

1. Pemberian kefir sari kedelai dengan dosis pemberian 0,5 ml/100gBB mampu mencegah peningkatan aktivitas protease sebesar 6,98%, dosis 1 ml/100gBB sebesar 28,27%, dan dosis 1,5 ml/100gBB sebesar 44,26%. Dosis 1,5 ml/100gBB merupakan dosis terbaik dalam mencegah kenaikan aktivitas protease pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar boraks melalui pakan.
2. Pemberian kefir sari kedelai mampu mencegah adanya kerusakan jejunum berupa deskuamasi epitel, menurunkan adanya infiltrasi sel radang, dan adanya hemoragik pada jaringan jejunum terhadap tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar boraks melalui pakan sebesar 10.300 ppm boraks.

### 6.2 Saran

Diperlukan penelitian lanjutan terhadap kefir sari kedelai 5% sebagai efek preventif toksisitas boraks dan penggunaan dosis lebih dari 1,5 ml/100gram BB yang dapat dijadikan sebagai dosis optimum preventif toksisitas boraks atau logam berat lain yang terdapat dilingkungan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adinugroho, N. 2013. Pengaruh Pemberian Boraks Dosis Bertingkat terhadap Perubahan Gambaran Makroskopis dan Mikroskopis Hepar Selama 28 Hari (Study pada Tikus Wistar). [Laporan Hasil Karya Tulis Ilmiah]. Universitas Diponegoro.
- Ahmed, Goldsmith A.A., J., Fokt I., Le X.F., Krzysko K.A., Lesyng B., Bast R.C. and Priebe W. 2011. A Genistein Derivative, ITB-301, Induces Microtubule Depolymerization and Mitotic Arrest in Multidrug-resistant Ovarian Cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. [Epub ahead of print].0344- 5704.
- Airlangga, H., Savitri E., dan Arfarita N. 2015. Observasi Efek Ekstrak Etanol Daun Bambu Jawa (*Gigantochloa Atter*) dengan Parameter Fisik dan Fisiologi Hewan Uji Tikus (*Rattus* sp) yang Diinduksi Boraks. *Journal El-Hayah* 5(2):83-88.
- Arya, P. W. M. I., Chandra Md, Piraksa I. W., Besung I. N. K., dan Suwiti N. K. 2012. Pengaruh Pemberian Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Gambaran Mikroskopis Usus Halus Mencit yang Diinfeksi Salmonella Typhi. *Buletin Veteriner Udayana*. 4(2): 73-79.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 2005. *Official Methods of Analysis*. Washington, DC.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai Dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri Dan Hasil Pertanian* 13(2).
- Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian . 2008. Mutu Kedelai Nasional Lebih Baik Dari Kedelai Impor. [Siaran Pers].
- Biro Hukum dan Humas BPOM RI. 2013. Peningkatan Pemahaman Standar Keamanan Pangan dalam Mendukung Daya Saing Produk Pangan. [Siaran Pers]. Badan POM RI : Jakarta.
- Bratawidjaja, K. 2013. *Imunologi Dasar*. Edisi ke-10. Jakarta:penerbit FK UI.
- Campbell, N.A., Reece J.B., Urry L.A., Cain M.L., S.A. Wasserman, Minorsky P.V., dan Jackson R.B.. 2008. *Biologi*. Edisi ke-8 Jilid 1. Erlangga. Jakarta.
- Caughey, G. H. 2011. *Mast Cell Protease As Protective and Inflammatory Mediators*. Depatment Of Medicine, University of California San Fransisco, USA

- Chapman, HA, Riese R.J, Shi G.P. 1997. *Emerging Roles for Cysteine Protease in Human Biology*. Annu Rev Physiol. 1997;59:63-88.
- Chattopadhyay, I., Bandypadhyay U., Bisman K., Maity P. and Banerjee R.K.. 2006. *Indomethacin Inactivates- Gastric Peroxidase To include Reactive Oxygen Mediated Gastric Mucosal Injury And Curcumin Protect It by Preventing Peroxidase Inactivation and Scavenging reactive Oxygen*. Free radic Bio Med. 40(8): 139-408.
- Cox Caroline. 2004. Boric Acid and Borates. *Journal Of Pesticide Reform* 24 (2).
- Dadhak, S., Pourahmas R., Assadi M.M., and Moghimi A.. 2011. Kefir Production from Soymilk. *Annals of Biological Research* 2(6):293-299.
- Dourson, M. A., Mater B., Meek F., Bareille R., Baquey. 2003. Boron Tolerable Intake Re-evaluation of Toxicokinetics for Data Derived Uncertainly Factors *Biol Trace Elem Res* 66 (1-3) : 453-463.
- Elbakary, N. A., Gikan M. Sahiman, Sadika M, Taufik, Shaimaa M. Zaher. 2014. Evaluation of the Possible Protective role of Vitamin A on Methatrexate-Induced Changes on the Jejunal Mucosa of Adult Male Albino Rat Histological and Immunohistochemical Study. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* (2) 77-93.
- EPA. 2008. Health Effects Support Document for Boron. [Health and Ecological Criteria Division]. Washington DC
- Faridah, B., Aznam N. dan Susanti H.. 2011. Uji Efek Anthiperglikemik Ekstrak Etanol Daun Kacapiring (*Gardenia augusta*, Merr) pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, Vol. 1, No. 1, 2011:43-53.
- Farnworth, E.R. 2005. Kefir – a Complex Probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Food* 2(1) : 1-17
- Fратиwi, Yulneriwarni dan Noverita. 2008. Fermentasi Kefir dari Susu Kacang-Kacangan. *VIS VITALIS* t(2).
- Fujii, Luchi J. Y., Matsuki S., and T. 2003. Cooperative Function of Antioksidant and Redox System Against Oxidative Stress in Male Reproductive Tissues. *Asian J. Androl* 5:231-242.
- Gunstream, S.E. and Harold S.B. 2001. *Anatomi and Physiology: Laboratoy Text Book Essentsial Version*, 3<sup>rd</sup> Edition. American: Mc Graw Hill.
- Hamer, F. and Janet H.. 2004. *The Potter's Dictionary of Material and Techniques* 5<sup>th</sup> edition. A and C black Publisher. London.



- Hariono, B. 2006. Efek Pemberian Plumbum (timah hitam) organik pada tikus putih (*Rattus Norvegicus*). *Jurnal Sain Vet.* 24 (1).
- Hidayati, N. 2006. Isolasi, Identifikasi dan Karakterisasi *Lactobacillus Plantarum* Asal Daging Sapi sebagai Kultur Starter Pembuatan Sosis Fermentasi. [Skripsi]. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Hrapkiewicz, K., L., Colby, and Denison P. 2013. *Clinical Laboratory Animal Medicine An Introduction Fourth Edition*. Wiley Blackwell. USA.
- Ignarro, L. J. 2000. *Nitric Oxide : Biology and Pathobiology*. Department of Molecular and Medical Pharmacology UCLA Schol of Medicine Los Angeles California 293-295.
- Kabu, M., Tasun M., Elitak B., and Akosman M.S. 2015. Histological Evaluation of the Effects of Borax Obtained from Various Sources in Different Rat Organs. *Int Journal Morphol* 33(1) 255-261.
- Kaspul. 2010. Kadar Testosteron Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Stelah Perlakuan dengan Boraks. *Journal Sains dan Terapan Kimia*. 4(2):91-100.
- Kesekas, H., Dinkei N., Seekin K., Kinik O., and Gone S.. 2010. Antioksidant Properties of Kefir Produced From Different Cow And Soy Milk Mixtures. *Journal Of Agriculture Science*. Turkey.
- Khamid, I. R. 2006. *Bahaya Boraks bagi Kesehatan*. Penerbit kompas : Jakarta.
- Krieger, R. 2001. *Handbook of Pesticide Toxicology Two-Volume Set*. University of California. Riverside (2) 1430-1431
- Krinke, G. J. 2000. *The Hand Book of Laboratory Animal, The Laboratory Rat*. Midas Printing Ltd, Scotland 349-353.
- Kumalaningsih, S. 2006. *Antioksidan Alami : Penangkal Radikal Bebas, Sumber, Manfaat, dan Cara Penyediaan*. Cetakan Pertama. Trubus Agrisana.
- Kumar, R. and Vats R. 2010. Protease Production by *Bacillus subtilis* Immobilized on Different Matrices. *New York Science Journal* 3(7): 20-24
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Cetakan pertama. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.



- Lee, J., Koo N., and Min D.B.. 2004. *Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals*. Compre Rev. In Food Set. And Food Safety 3: 21-33.
- Liu, J.R., Chen M.J., and Lin C.W.. 2005. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk-Kefir and Soymilk-Kefir. *J. Agric. Food Chem*, 53:2467-2474.
- Mahdi, C. 2010. Bahaya Makanan Berformalin dan Cara Mengatasinya. Pidato Pengukuhan Guru Besar dalam Bidang Ilmu Biokimia.
- Mark, H. A. 2013. *Embriology Gastrointestinal Tract – Jejunum Histology*. UNSW CRICOS Provider Code No. 00089G.
- Markwick. 2004. *Diet and Human Immune Function. Probiotics and Immunomodulation*. New Jersey 327-339.
- McCue,P.P. and Shetty K.. 2004. *Phenolic Antioksidant Mobilization During Yogurt Production From Soymilk Using Kefir Culture*. *Process Biochemistry* 40: 1791-1797.
- Muchtadi. 2005. Teknologi Proses Pengolahan Pangan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Biochemical Characterization of Lactit Acid Bacteria Isolated from Fish and Prawn. *J. of Culture Collection*, 4(02):48-52. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Mutiyani, M. 2005. Pengaruh Pemberian Diet Tinggi Karbohidrat Dibandingkan dengan Diet Tinggi Lemak terhadap Kadar Glukosa Darah dan Kepadatan Sel Beta Pankreas pada *Rattus Novergicus* Strain Wistar. [Skripsi]. Program Studi Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Naiola, E. dan Widhyastuti N.. 2007. Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease. *Jurnal Penelitian Hayati*.13(51-56)
- Nuraini, A. D. 2002. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari *Bacillus Laterosporus*. [Sripsi]. Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya. Malang.
- Octavia Lambok SR. 2012. Pengaruh Pengetahuan dan Motif Ekonomi terhadap Penggunaan Formalin dan Boraks oleh Pedagang dalam Pangan Siap Saji (Bakso) Di Kecamatan Medan Denai dan Medan Tuntungan Tahun 2011.[Tesis]. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Sumatra Utara.
- Oteiza, P.I., Erlejman A.G., Verstraeten S.V., Keen C.L., and Fraga C.G.. 2005.Flavonoid-membrane Interactions : A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface. *Journal Clin. and Dev.Immunol*. 12(1): 19-25.

- Pongsavee, M. 2009. Effect of Borax on Immune Cell Proliferation and Chromatid Exchange in Human Chromosome. *Jurnal of Medical and Toxicology*.
- Purnama, M.T.E., Widjaya N.M.R., dan Plumeriastuti H.. 2013. Pengaruh Boraks terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Veterinaria medika* 6(2).
- Ranuh, R., Subijanto M.S., Ingrid S., dan Aulanni'am. 2008. *The Role of Probiotik Lactobacillus Plantarum IS 20506 on Occludin and ZO 1 of intestinal Tight Junction Rehabilitation*. Makalah Seminar Nasional Basic Science Universitas Brawijaya
- Saparinto, C. dan Hidayati D.. 2006. *Bahan Tambahan Pangan*. Cetakan Pertama. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 57-62.
- Segal, A.W. 2005. *How Neutrophils Kill Microbes*. *Annu. Rev. Immunol.* 23:197-223.
- Silalahi, J. 2001. Free Radicals and Antioxidant Vitamins in Degenerative Disease. *The Journal of the Indonesian Medical Association*. (11), 1 - 13.
- Siregar, C. T. 2004. Nutrisi. Fakultas Kedokteran. Universitas Sumatra Utara, and Anti-inflammatory Pathways. *Gastroenterology Research and Practice* Volume 2011.
- Sugiyanto, 1995. Petunjuk Praktikum Farmasi Edisi IV. Laboratorium Farmasi dan Taksonomi UGM, pp : 11-12.
- Suhanda, R. 2012. Higiene Sanitasi Pengolahan dan Analisa Boraks pada Bubur Ayam yang Dijual di Kecamatan Medan Sunggal Tahun 2012. [Skripsi]. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Suntaka Dwi Fitri A.L., Joseph Woodford B.S., Sondakh R.C. 2014. Analisis Kandungan Formalin dan Boraks pada Bakso yang Disajikan Kios Bakso Permanen pada Beberapa Tempat di Kota Bitung Tahun 2014. *Journal Fakultas Kesehatan Masyarakat*. Universitas Sam Ratulangi.
- Suryohudoyo, P. 1993. Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas. *Journal Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair*.
- United States Environmental Protection Agency. 2008. Health Eggect Support Document for Boron. //http:www.epa.gov/safewater/cci/pdf/boron.pdf [Diakses tanggal 25 April 2015].
- Valko, M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M and Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 160:1-40.

- Wang, H. and Murphy P.A.. 1994. Isoflavon Content in Commercial Soybeans Foods. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1666-1673.
- Wardanella, M. 2008. Studi Histopatologi Pengaruh Pemberian Enterotosin Enterobacter Sakazaki pada Mancit (*Mus musculus*) Neonatus. [Skripsi]. FKH IPB hal 58-62.
- Weir, R.J., Jr. and Fisher, R.S. 1972. *Toxicologic studies on borax and boric acid*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23: 251.
- Weiss, S.J. 1989. Tissue Destruction by Neutrophil. *New Engl. J. Med.* 320:365-375.
- Westerheide, S.D., and Marimoto R.I. 2005. Minireviews: Heat Shock Response Modulators as Therapeutic Tools for Disease of Protein Conformation. *J. Biol. Chem.* 280:33097-33100. <http://www.jbc.org/>[Diakses tanggal 25 April 2015].
- Widjaya, C. H. 2003. *Peran Antioksidan Terhadap Kesehatan Tubuh*. Healthy Choice. Edisi IV.
- Winarno. 2007. Analisis Laboratorium. Bogor : M.Brio-Press
- Wolfenshon, S. and Lloyd M. 2013. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare 4<sup>th</sup>*. Wiley-Blackwell. West Susset.
- Xu, an Cranwell P.D.. 2003. *Gastrointestinal and Nutrition the Neonatal Pig*. United.
- Zang, H.Y. 2005. *Structure Activity Relationships and Rational Design Strategies for Radical Scavenging Antioxidants*. *ComputerAided Drug Design*. 1:257-273.